

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**FUNCIÓN DE LA CADENA $pT\alpha$ EN LA
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN
MEMBRANA Y LA SEÑALIZACIÓN DEL
COMPLEJO pre-TCR HUMANO**

TESIS DOCTORAL

MARÍA DE LAS NIEVES NAVARRO LOBATO
Madrid, 2006

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, bajo la dirección de la Dra. María Luisa Toribio, gracias a la financiación procedente de una beca predoctoral FPI del Ministerio de Educación y Ciencia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer esta tesis a su principal responsable, Marisa. En este laboratorio he crecido tanto personal como científicamente. Gracias por enseñarme este mundo.

En segundo lugar, a mi familia. A mis padres, Antonio y Cándida, a mis hermanas, Sonsoles y Camino, y a Iván G.G. Gracias por estar siempre, a pesar de no entender qué es el pre-TCR.

En tercer lugar, y no por ello menos importante, a mis compañeros de laboratorio. A Marina, que me ha acompañado todo el rato. A los niños, Sara, Kike y Juan, sin palabras, sois estupendos. A las incorporaciones más recientes, Patricia y Sara, especialmente a Patri, no cambies nunca, le pones “mojo” a todo lo que haces. A los que estuvieron y se fueron, Gretel, compañera en lo malo y en lo bueno, a Ángel y a Yoli. Y un agradecimiento muy especial a mis primeras maestras “chispas”, Almudena y Virginia, fuentes de paciencia y sabiduría infinita.

A mis amigas, María, Susana y Patricia, no tengo recuerdos sin vosotras. Gracias por apoyarme a pesar del horror que os producen las bacterias y los ratones.

A toda la gente que me ha ayudado durante todo en tiempo desde que llegué al CBM. A Alicia y a Juanfra, por esos “Jurásicos” conciliadores, a María, por rescatarme con un café. A los Balbinos, empezando por el jefe, a Pilar, Aldo, Manolo, Esther, Edgar y Ruth, pocas veces se juntará un grupo de personas tan inteligente y amable (excepto en el C-104, claro). A Pili y a Ana, por ese inolvidable viaje a Grecia. A todos los componentes, presentes y pasados del C-208, sois tantos que seguro que me dejo alguno. A Loli, por sonreír siempre que te piso el suelo, y a Paco, gracias por salvar nuestro bienamado Coulter en tantas ocasiones. A Raúl P., África, Juan, Dani, Aaron, gracias a todos por aguantar mis rollos.

ABREVIATURAS

APC, alofococianina (Allophycocyanin)

BFA, brefeldina A

BSA, albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin)

CD, grupo de diferenciación (Cluster of Differentiation)

CD2AP, proteína asociada a CD2 (CD2 Associated Protein)

CHX, cicloheximida

Cin85, Cbl-interacting protein of 85kDa

Cit.D, citocalasina D

CLQ, cloroquina

CMS, p130Cas ligand with multiple SH3 domains

C-terminal, carboxilo terminal

DNA, ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

DN, doble negativa (CD4⁻CD8⁻)

DP, doble positiva (CD4⁺CD8⁺)

EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor)

EPOX, epoxomicina

et al., y otros (et alii)

FBS, suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)

FITC, fluoresceína (Fluorescein-isotiocianato)

GFP, proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

GST, Glutación S-Transferasa

HBSS, tampón de incubación de Indo-1AM (Hanks Balanced Salt Solution)

Igs, inmunoglobulinas

ISP, simple positiva inmadura (Immature Single Positive)

kD, kiloDalton

LCY, lactacistina

MFI, media de la intensidad de fluorescencia

MHC, complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)

N-terminal, amino terminal

PBS, tampón fosfato salino (Phosphate-buffered Saline)

PCR, reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PC5, ficoeritrina-cianina (Phycoerytrin Cyanin 5.1)

PDGFR, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor Receptor)

PE, ficoeritrina (Phycoerytrin)

PI3-quinasa, fosfatidil-inositol 3 quinasa

PKC, proteína quinasa C (Protein Kinase C)

PM, Peso Molecular

PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF, Polyvinylidene fluoride

pT α , pre-TCR alpha

RNA, ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)

SD, desviación estándar

SDS-PAGEs, electroforesis en geles de acrilamida/bis-acrilamida desnaturalizantes

SH3, dominio de homología a Src-quinasas 3 (Src Homology 3 domain)

SP, simple positiva (CD4⁺ o CD8⁺)

TCR, receptor de antígeno para células T (T Cell Receptor)

TRITC, rodamina (Tetramethylrhodamine isothiocyanate)

TxR, Texas-Red

INDICE

SUMMARY,

Página 2

INTRODUCCIÓN

Páginas 4-20

Diferenciación de los linfocitos T	Página 5
El pre-TCR y el proceso de selección β	Página 8
Composición bioquímica del complejo pre-TCR	Página 9
La cadena pre-TCR α	Página 11
Regulación de la expresión en la membrana del complejo pre-TCR	Página 13
Inició de la señal del pre-TCR: señalización constitutiva	Página 16
La señalización a través del complejo pre-TCR	Página 18

OBJETIVOS

Página 22

MATERIALES Y MÉTODOS

Páginas 24-37

1. Líneas celulares	Página 24
2. Citometría de flujo	Página 24
3. Construcciones	Página 26
3.1 Construcciones de pT α	Página 26
3.2 Construcciones de Cin85 y CMS	Página 27
4. Transfecciones transitorias y obtención de transfectantes estables	Página 30
5. Producción de sobrenadantes retrovirales y transducción de la línea JR3.11	Página 30
6. Cinéticas de expresión en membrana por citometría de flujo	Página 31
7. Microscopía confocal	Página 31
8. Internalización de la cadena pT α	Página 32
9. Aislamiento <i>ex vivo</i> de poblaciones de timocitos	Página 33
10. Inmunoprecipitaciones	Página 33
11. Marcaje de proteínas de membrana con biotina	Página 34
12. Detección de proteínas mediante <i>Western-Blot</i>	Página 34
13. Ensayos de unión <i>in vitro</i> (<i>Pull-down</i>)	Página 35
14. Análisis de la expresión de genes a nivel transcripcional (<i>Northern-Blot</i>)	Página 35
15. Movilización de calcio por citometría de flujo	Página 36
16. Ensayos de actividad transcripcional de NFAT	Página 36

RESULTADOS

Páginas 39-88

1. Dinámica de la expresión en membrana del complejo pre-TCR

Páginas 39-63

1.1 Proceso de endocitosis del complejo pre-TCR	Página 40
---	-----------

1.2	Degradación constitutiva del complejo pre-TCR	Página 43
1.3	El dominio citoplásmico de la cadena pT α es responsable de la degradación constitutiva del complejo pre-TCR	Página 48
1.4	Cinética de internalización y transporte intracelular del complejo pre-TCR	Página 50
1.4.1	Internalización de la cadena pT α en la línea celular SupT1	Página 52
1.4.2	Internalización de la cadena pT α en timocitos pre-TCR aislados <i>ex vivo</i>	Página 55
1.4.3	Implicación de las Src-quinasas y el citoesqueleto de actina en los procesos de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR	Página 57
2.	Identificación de adaptadores intracelulares del complejo pre-TCR	Páginas 64-88
2.1	Ligandos intracelulares de la cadena pT α : CMS y Cin85	Página 66
2.2	Identificación de los motivos implicados en la interacción pT α -CMS/Cin85	Página 68
2.2.1	Cin85 y CMS interaccionan con el dominio citoplásmico de pT α mediante distintos motivos SH3	Página 68
2.2.2	Identificación del motivo específico de unión a Cin85/CMS en el dominio intracelular de la cadena pT α humana	Página 69
2.2.3	La proteína CD2BP3 se recluta a pT α mediante su asociación con CMS y Cin85	Página 71
2.3	Regulación diferencial de la expresión de los genes de Cin85 y CMS durante el desarrollo intratímico humano	Página 73
2.4	Estudio dinámico de la interacción entre CMS y pT α	Página 75
2.4.1	Distribución intracelular de CMS: localización en los compartimentos endocíticos de células pre-T humanas	Página 75
2.4.2	Reclutamiento de CMS y el citoesqueleto de actina al sitio de activación del complejo pre-TCR	Página 77
2.4.3	CMS colocaliza con pT α en la ruta endocítica de las células pre-T humanas	Página 80
2.5	Relevancia funcional del motivo de unión a CMS en el dominio citoplásmico de pT α	Página 80
2.5.1	El motivo de unión a CMS en el dominio citoplásmico de pT α no es imprescindible en el proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR	Página 82
2.5.2	El motivo de unión a CMS en el dominio citoplásmico	Página 85

de pT α está implicado en la función del complejo pre-TCR

DISCUSIÓN	Páginas 90-106
Internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR	Página 90
Mecanismos moleculares que participan en la internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR	Página 93
Ligandos intracelulares de la cadena pT α	Página 96
CONCLUSIONES	Páginas 108-109
BIBLIOGRAFIA	Páginas 111-124
ANEXO	Página 126

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema del desarrollo de los linfocitos T en ratón y humano.	Página 7
Figura 2. Esquema de la composición bioquímica del complejo pre-TCR.	Página 8
Figura 3. Alineamiento de la secuencia de la cadena pTα en humano y ratón.	Página 12
Figura 4. Esquema de los mecanismos de transporte intracelular de receptores de membrana.	Página 15
Figura 5. Esquema de los mecanismos de transporte intracelular descritos para el TCR en condiciones de reposo y estimulación.	Página 16

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 6. Esquema construcciones y oligonucleótidos de pTα.	Página 27
Figura 7. Esquema construcciones y oligonucleótidos Cin85/CMS.	Página 28
Tabla I. Anticuerpos primarios.	Página 24
Tabla II. Anticuerpos secundarios.	Página 25
Tabla III. Lista de oligonucleótidos.	Página 28

RESULTADOS

Figura 8. Niveles de expresión de CD3 en timocitos pre-TCR ⁺ y CD4SP.	Página 39
Figura 9. Niveles de expresión de pre-TCR y TCR en SupT1 y SupT1-TCRαβ.	Página 40
Figura 10. Esquema del efecto de la cicloheximida y la brefeldina A sobre los procesos de transporte intracelular.	Página 41
Figura 11. Cinéticas de expresión en membrana de pre-TCR y TCR en presencia de brefeldina A y cicloheximida.	Página 42
Figura 12. Localización intracelular de la proteína quimérica TCRζ-GFP.	Página 44
Figura 13. Cinéticas de expresión de pre-TCR en membrana y de la quimera TCRζ-GFP en presencia de brefeldina A y cicloheximida.	Página 45
Figura 14. Cinéticas de expresión intracelular de TCRβ y TCRζ en presencia de cicloheximida.	Página 46
Figura 15. Degradación constitutiva de los dímeros pTα/TCRβ.	Página 47
Figura 16. Niveles de expresión de TCR en las células SupT1-TCRα/pTα.	Página 48
Figura 17. Cinéticas de expresión en membrana e intracelular de la quimera TCRα/pTα en presencia de brefeldina A y cicloheximida.	Página 50
Figura 18. Cinética de expresión en membrana de pTα y CD3 en presencia de anticuerpos anti-pTα y anti-CD3.	Página 51
Figura 19. Esquema del marcaje del pre-TCR con anti-pTα para	Página 52

microscopía confocal.

Figura 20. Cinética de internalización de la cadena pT α en la línea SupT1 mediante microscopía confocal.	Página 54
Figura 21. Cinética de internalización de la cadena pT α en timocitos pre-TCR ⁺ aislados <i>ex vivo</i> mediante microscopía confocal.	Página 56
Figura 22. Cinéticas de expresión en membrana de pre-TCR en presencia de cicloheximida y los inhibidores PP2 y citocalasina D.	Página 58
Figura 23. Cinéticas de internalización del complejo pre-TCR en presencia de los inhibidores PP2 y citocalasina D.	Página 59
Figura 24. Cinética de internalización de la cadena pT α en la línea SupT1 en presencia de los inhibidores PP2 y citocalasina D mediante microscopía confocal.	Página 61-62
Figura 25. Esquema del dominio citoplásmico de la cadena pT α y de la familia de adaptadores Cin85/CMS.	Página 65
Figura 26. Interacción entre el dominio citoplásmico de la cadena pT α y la familia de adaptadores Cin85/CMS.	Página 67
Figura 27. Identificación de los dominios de unión de Cin85/CMS al dominio citoplásmico de la cadena pT α .	Página 69
Figura 28. Identificación del motivo de unión en el dominio citoplásmico de la cadena pT α a Cin85/CMS.	Página 70
Figura 29. CD2BP3 se recluta a pT α a través de su interacción con Cin85/CMS.	Página 72
Figura 30. Regulación diferencial de la expresión de los genes Cin85/CMS durante el desarrollo intratímico.	Página 74
Figura 31. Distribución intracelular de CMS: relación con el citoesqueleto de actina.	Página 76
Figura 32. Distribución intracelular de CMS: relación con la ruta de endocitosis.	Página 77
Figura 33. CMS se recluta a la zona de agregamiento del pre-TCR.	Página 78
Figura 34. CMS y el citoesqueleto de actina se reclutan a la zona de activación del pre-TCR.	Página 79
Figura 35. CMS colocaliza con pT α en la ruta de endocitosis.	Página 81
Figura 36. La eliminación de Pro2 no altera la unión de pT α a TCR β ni la expresión de CD3 en membrana.	Página 82
Figura 37. El motivo Pro2 no está implicado en la internalización del complejo pre-TCR.	Página 83
Figura 38. El motivo Pro2 no está implicado en la degradación del complejo pre-TCR.	Página 84

Figura 39. El motivo Pro2 está implicado en la movilización de calcio inducida por el pre-TCR.	Página 85
Figura 40. El motivo Pro2 está implicado en la actividad transcripcional de NFAT inducida por el pre-TCR.	Página 86
Figura 41. El motivo Pro2 está implicado en la actividad transcripcional constitutiva de NF- κ B inducida por el pre-TCR.	Página 87
Figura 42. Implicación funcional de CMS en la actividad transcripcional de NFAT inducida por el pre-TCR.	Página 88

DISCUSIÓN

Figura 43. Modelo del proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR en presencia o ausencia de actividad Src-quinasa y el citoesqueleto de actina.	Página 95
Figura 44. Modelo de la interacción entre pT α y CMS.	Página 98
Figura 45. Modelo de activación en condiciones de sobreexpresión y ausencia de CMS.	Página 103
Figura 46. Modelo del reclutamiento y función de CMS en el contexto de la señalización a través del pre-TCR.	Página 105

SUMMARY

SUMMARY

The pre-TCR, composed by TCR β chain paired with the invariant pre-TCR α (pT α) chain and the CD3 subunits (ϵ , γ , δ and ζ), is transiently expressed during T cell development at the β -selection checkpoint. Surface expression of the pre-TCR signals the selection, expansion, TCR β allelic exclusion and further differentiation of developing pre-T cells, in a ligand independent manner. For a long time, the pT α chain has been considered just as a structural component of the pre-TCR, but previous results from our laboratory have suggested an important role of the intracellular domain of human pT α in the regulation of pre-TCR expression and function.

In this study, we have approached at the molecular level the role that the human pT α chain plays in pre-TCR function, focussing on the specific properties of its cytoplasmic domain. Particularly, we investigated the contribution of the pT α cytoplasmic domain to two main physiological features: 1) the regulation of pre-TCR cell surface expression, and 2) the constitutive activation of the pre-TCR. We first analyzed the dynamics of the pre-TCR cell surface expression and down-modulation in pre-T cell. Using different experimental procedures, which include flow cytometry, confocal microscopy and biochemical techniques, we showed that surface pre-TCR complexes are continually and rapidly endocytosed and degraded in the absence of extracellular ligation but do not recycle back to the cell surface. Therefore, the human pre-TCR behaves constitutively as an activated TCR without any need for ligand binding. We demonstrated in this study that the cytoplasmic domain of the pT α chain is sufficient to confer constitutive internalization and degradation properties to the conventional TCR, thus supporting its functional relevance in normal pre-TCR turnover. In addition, we show that the equilibrium between internalization and reexpression of the pre-TCR is partially dependent on Src-kinases activity, while sorting of internalized complexes to lysosomal degradation is critically dependent on an intact actin cytoskeleton. These data suggest that the regulation of constitutive internalization and degradation of the pre-TCR complex by the pT α cytoplasmic domain is a key process that controls surface receptor levels and provides the cell with a self-safe mechanism to avoid sustained ligand-independent signalling through a potentially oncogenic receptor.

The second part of this study was aimed at identifying potential adaptors proteins which could confer specific functional properties to the pre-TCR. We identified a poly-proline-arginine sequence in the human pT α cytoplasmic tail which fits the reported recognition consensus for SH3 domains of the Cin85/CMS family of adaptors. This pTa motif was indeed shown to interact with Cin85/CMS SH3 domains both *in vitro* and *in vivo*, and to mediate the recruitment of multiadaptor complexes containing all family members (CMS, Cin85 and CD2BP3). Using confocal microscopy approaches, we also showed that activation through the pre-TCR induced pre-TCR clustering and early recruitment at pre-TCR activation site of CMS and polymerized actin, which later localized to endosomal vesicles. Moreover, internalized pT α was shown to colocalize with CMS in the endocytic pathway. Lastly, we found that the deletion of Cin85/CMS-binding motif impaired pre-TCR signalling, as measured by Ca²⁺ mobilization or NFAT and NF- κ B transcriptional activity. These results identify Cin85/CMS proteins as the first known intracellular adaptors of pT α involved in pre-TCR function. We conclude that the cytoplasmic domain of the human pT α chain regulates both the pre-TCR cell surface expression and signalling.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T son células del sistema inmune que ejercen un papel central durante la respuesta contra patógenos, ya que se encargan de activar y regular las respuestas inmunes humoral y celular. Su principal función es desencadenar respuestas específicas ante cualquier antígeno potencialmente extraño. Esta capacidad se debe a que cada linfocito T presenta la capacidad de reconocer específicamente a un antígeno extraño, de manera que, colectivamente, los linfocitos T portan un enorme repertorio de receptores que les permite reconocer cualquier antígeno generado en la naturaleza.

Las funciones y capacidades de los linfocitos T se basan en una característica fundamental de estas células: la presencia en la membrana celular del receptor para antígeno de las células T, o TCR por sus siglas en inglés (*T Cell Receptor*). El TCR está compuesto de dos cadenas polipeptídicas, TCR α y TCR β , unidas covalentemente mediante un puente disulfuro, que se asocian de forma no covalente al complejo CD3 (formado por las proteínas CD3 ϵ , γ , δ y TCR ζ). Una minoría de los linfocitos T circulantes porta una pareja alternativa de cadenas TCR, las cadenas TCR γ y TCR δ . La capacidad de reconocimiento de antígeno reside en los dímeros TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, mientras que las cadenas invariantes del complejo CD3 tienen como función el transporte del complejo completo a la superficie celular y la transducción de señales al interior celular cuando se produce el reconocimiento del antígeno (Clevers *et al.*, 1988).

La especificidad de reconocimiento del TCR está determinada por un mecanismo genético exclusivo de las células linfoides que tiene lugar durante el desarrollo. Cada cadena variable del TCR no puede estar codificada por completo en el genoma, puesto que se requerían más genes sólo para codificar las cadenas del TCR de los que existen en el genoma completo. La variabilidad en el reconocimiento de antígenos se genera gracias al reordenamiento génico, que consiste básicamente en que las distintas regiones del TCR (variable, V, diversidad, D, unión, J, y constante, C) están codificadas en múltiples segmentos génicos, que se unen mediante recombinación somática del DNA para dar lugar a las cadenas del TCR. Los distintos segmentos son seleccionados al azar para su recombinación, y las diferentes combinaciones explican la mayor parte de la diversidad del repertorio de los linfocitos T. El proceso de reordenamiento génico es un mecanismo que también ocurre durante el desarrollo de los linfocitos B, y que determina la diversidad del repertorio de las inmunoglobulinas (Igs).

El reconocimiento de antígeno de forma específica es una característica exclusiva de los linfocitos T y B, pero la manera en la que se lleva a cabo este reconocimiento difiere entre ambos tipos celulares, de manera que los linfocitos T, a través del TCR, reconocen el antígeno en forma de pequeños péptidos derivados de las

proteínas del patógeno presentados por glicoproteínas de membrana especializadas que reciben el nombre de complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés, *Major Histocompatibility Complex*). El reconocimiento de fragmentos peptídicos extraños unidos a las moléculas del MHC en la membrana de una célula presentadora de antígeno es una propiedad fundamental de los linfocitos T que se adquiere durante el proceso de diferenciación y selección en el timo.

Diferenciación de los linfocitos T

Los linfocitos T, al igual que el resto de componentes del sistema inmune, se generan a partir de células troncales hematopoyéticas residentes en la médula ósea del individuo adulto. Sin embargo, mientras que el resto de linajes hematopoyéticos se generan mayoritariamente en la médula ósea, los precursores de los linfocitos T deben cambiar su localización anatómica y migrar al timo para seguir su programa de desarrollo. La diferenciación de los linfocitos T en el timo es un proceso mediante el cual los precursores hematopoyéticos adquieren las capacidades específicas antes descritas, es decir, el reconocimiento de antígenos extraños en el contexto del MHC propio, que desencadena el proceso de la respuesta inmune adquirida ante patógenos.

La diferenciación de distintos linajes a partir de las células troncales hematopoyéticas multipotenciales tiene lugar a través de la generación de precursores intermediarios de potencial más restringido (Blom y Spits, 2006). Los precursores que migran desde la médula ósea hasta el timo aún no están restringidos al linaje de los linfocitos T, de manera que conservan la capacidad de generar linfocitos B, células NK (Natural Killer), células dendríticas (De Smedt *et al.*, 2005; Shortman y Wu, 1996), e incluso células mieloides (de Yebenes *et al.*, 2002; Marquez *et al.*, 1995; Marquez *et al.*, 1998) aunque dentro del timo se generan mayoritariamente linfocitos T del linaje $\alpha\beta$. El desarrollo de los linfocitos T conlleva el paso por distintos estadios de diferenciación, cada uno de ellos caracterizado por un patrón de expresión génica único y un conjunto específico de marcadores de expresión en membrana. Durante las primeras fases del desarrollo tienen lugar los reordenamientos de las cadenas del TCR, y una vez se obtiene un complejo TCR funcional expresado en la membrana de las células, se seleccionan únicamente aquellas células capaces de reconocer con afinidad intermedia péptidos presentados en el contexto de moléculas de MHC propio. Tras esta selección final, los linfocitos T maduros abandonan el timo y se dirigen hacia los órganos linfoides periféricos (nódulos linfáticos, bazo, etc....), donde ejercerán su función (Blom y Spits, 2006).

Los distintos estadios de la diferenciación T en el timo se han identificado mediante la expresión de diferentes marcadores de membrana, principalmente las moléculas coestimuladoras CD4 y CD8. Aunque el proceso de diferenciación T en humanos y ratón es bastante similar en cuanto a la secuencia de eventos que tiene lugar, algunos de los marcadores difieren entre ambas especies. En la **Figura 1** se muestra un esquema de los procesos de diferenciación y marcadores usados en ambas especies para identificarlos. La población más inmadura dentro del timo humano y de ratón se conoce como doble negativa (DN), por la ausencia de los marcadores CD4 y CD8. Esta población se divide a su vez en cuatro subpoblaciones según la expresión de los marcadores CD44 y CD25 en ratón (**Figura 1**, CD44⁺CD25⁻ o DN1, CD44⁺CD25⁺ o DN2, CD44⁻CD25⁺ o DN3, y CD44⁻CD25⁻ o DN4), aunque dicha subdivisión no está conservada en humanos. Uno de los eventos más importantes que ocurre en las células que comienzan el programa de diferenciación de los linfocitos T es el inicio de los reordenamientos en el locus de TCR β . En el sistema de ratón, estos eventos ocurren en la población DN, concretamente, los primeros reordenamientos de TCR β se detectan en la población CD44⁻CD25⁺ o DN3 (Dudley *et al.*, 1994). En humanos, se detectan reordenamientos en baja frecuencia en la población CD4ISP (CD4 *Immature Single Positive*), y son mayoritarios en una población que ya expresa los marcadores CD4 y CD8, denominada DP (Doble Positiva) TCR $\alpha\beta$ ⁻ (Carrasco *et al.*, 2002; Ramiro *et al.*, 1996). La transición de células CD4ISP a DP TCR $\alpha\beta$ ⁻ representa el primer punto de control dentro de la diferenciación T, puesto que únicamente las células que hayan conseguido reordenar de forma productiva la cadena TCR β pasan al siguiente estadio de la diferenciación. Este punto de control se conoce como selección β , y depende de la expresión del complejo pre-TCR. En las células en las que exista una cadena TCR β productiva, ésta se une de forma covalente a la cadena invariante pre-TCR α o pT α , y se asocia a las cadenas CD3 ϵ , γ , δ y TCR ζ para formar el complejo conocido como pre-TCR. Este complejo se expresa a bajos niveles en la superficie celular, y constituye el sensor molecular que indica a la célula la presencia de una cadena TCR β reordenada productivamente (ver más adelante). La expresión del complejo pre-TCR desencadena la selección β , en la que las células reciben una señal de supervivencia y proliferación, tiene lugar la exclusión alélica en el locus TCR β , y las células pasan al siguiente estadio de diferenciación (von Boehmer y Fehling, 1997).

En ratón, la expresión del complejo pre-TCR tiene lugar durante la transición de la población CD44⁻CD25⁺ a la población CD44⁻CD25⁻ (paso de DN3 a DN4) y finalmente, promueve la expresión en membrana de los correceptores CD4 y CD8, dando lugar a la población doble positiva (DP). En esta transición se pasa por un estadio intermediario en el que primero se expresa el correceptor CD8 (CD8ISP), y después se expresa CD4 (Borst *et al.*, 1996; Kisielow y von Boehmer, 1995). En humanos, la

expresión del complejo pre-TCR y la selección β están asociados a la expresión de los marcadores CD4 y CD8, y tiene lugar mayoritariamente en la transición de la población las poblaciones CD4ISP a la CD4⁺CD8⁺ (Blom y Spits, 2006; Carrasco *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 1999) (**Figura 1**).

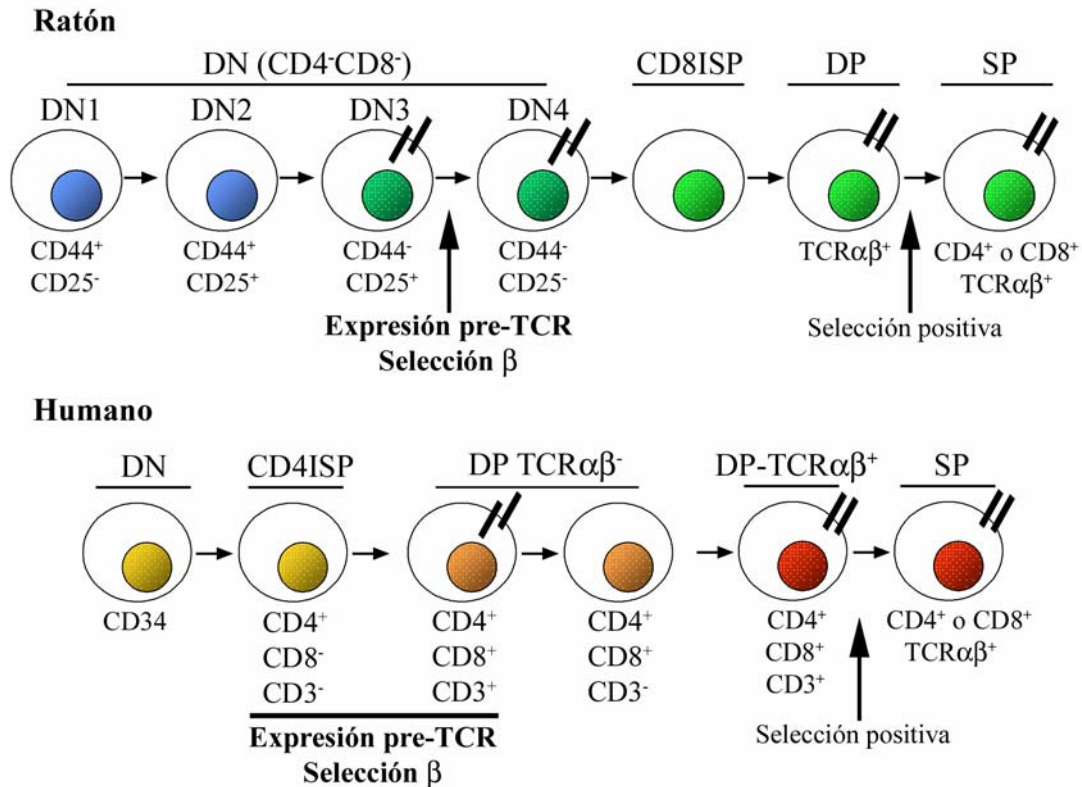


Figura 1. Esquema del desarrollo intratímico de los linfocitos T en ratón y en humanos.

Al finalizar la proliferación inducida por el pre-TCR se genera una población DP TCRαβ⁻ de células de pequeño tamaño, que ya no están en ciclo, en las que desaparece el complejo pre-TCR en la membrana y se recupera la expresión de los genes Rag1 y Rag2 implicados en los reordenamientos. Por tanto, estas células representan un estadio particular en el cual se inician los reordenamientos y la transcripción en el locus de TCRα (Trigueros *et al.*, 1998). Cuando se obtiene un reordenamiento productivo de TCRα, esta cadena se asocia con la cadena TCRβ preexistente y con los módulos de CD3, promoviendo la expresión del complejo TCRαβ. Una vez se expresa el complejo TCRαβ completo en la membrana de las células DP, éstas son sometidas a los procesos de selección positiva y negativa que determinan la supervivencia de las células T cuyo TCR sea capaz de reconocer péptidos en el contexto del MHC propio con una afinidad intermedia. Los procesos de selección positiva y negativa dependen del reconocimiento con distintas afinidades por parte de las células DP TCRαβ⁺ de las moléculas MHC

cargadas con péptidos propios que portan las células del estroma tímico, principalmente, las células epiteliales corticales y medulares, respectivamente. De esta manera, las células DP cuyo TCR sea incapaz de reconocer el MHC propio mueren por apoptosis mediante un mecanismo conocido como “muerte por defecto”. En el caso de un reconocimiento de alta afinidad, las células son seleccionadas negativamente, evitando que su exportación a la periferia desencadene respuestas inmunes contra componentes propios (autoinmunidad). Finalmente, los reconocimientos de afinidad intermedia conducen a la selección positiva y rescate de la apoptosis de las células DP que pasan al estadio final de la diferenciación como células simples positivas (SP). Durante la selección positiva, según el MHC reconocido (clase I o II), sólo se conserva uno de los correceptores (CD8 o CD4, respectivamente). Durante los procesos de selección positiva y negativa, sobreviven sólo el 1% de los timocitos (Shortman y Wu, 1996). Las células SP $CD4^+$ o $CD8^+$ se exportan a los órganos linfoides secundarios como células maduras capaces de ejercer su función dentro del sistema inmune (Blom y Spits, 2006; Kisielow y von Boehmer, 1995).

El pre-TCR y el proceso de selección β

El proceso de selección β constituye el primer punto de control del desarrollo de los linfocitos T, puesto que únicamente las células que hayan reordenado de forma productiva el locus de $TCR\beta$ pasan al siguiente estadio de diferenciación. Como ya se ha mencionado, una vez se produce un reordenamiento funcional, $TCR\beta$ se asocia a la cadena invariante $pT\alpha$ y junto con los módulos de CD3, forma el complejo pre-TCR, cuya representación esquemática se muestra en la **Figura 2**.

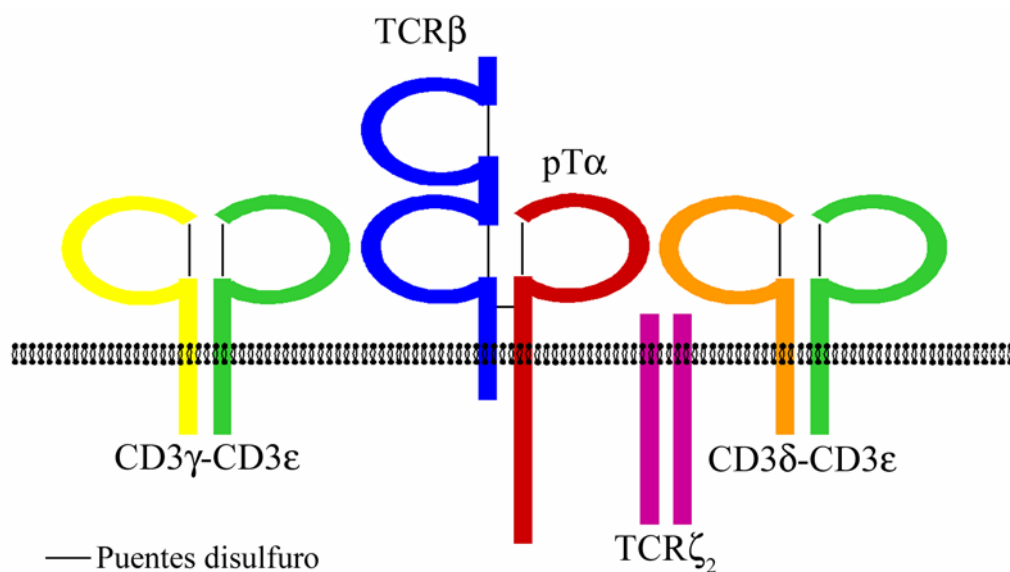


Figura 2. Representación de la composición bioquímica del complejo pre-TCR humano.

La expresión del complejo pre-TCR confiere una ventaja selectiva a las células que lo expresan en términos de supervivencia y proliferación. Puesto que la recombinación homóloga es un proceso que ocurre al azar, se ha calculado que sólo una de cada tres células consigue reordenar productivamente TCR β (Dudley *et al.*, 1994), mientras que el resto de las células, aproximadamente un 70%, mueren por apoptosis (Penit *et al.*, 1995). La primera consecuencia de la expresión del pre-TCR es el rescate de la muerte celular programada, que podría tener lugar mediante la inactivación de la proteína p53. La proteína p53 se activaría como consecuencia de la rotura en el DNA producida durante los reordenamientos de TCR β , induciendo una parada en el ciclo celular y finalmente el proceso de apoptosis. La señalización a través del pre-TCR inactivaría la proteína p53, promoviendo la supervivencia de estas células (Haks *et al.*, 1999). En este proceso también se ha implicado la activación del factor de transcripción NF- κ B por el complejo pre-TCR (Voll *et al.*, 2000). Además del rescate de apoptosis, el pre-TCR induce una gran expansión de las células que lo expresan. Se ha calculado que tras la expresión del pre-TCR, las células sufren hasta nueve rondas de división, por lo que se induce una enorme expansión (entre 50 y 100 veces) de la población intratímica con reordenamientos productivos para TCR β (Falk *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 1996; Penit *et al.*, 1995).

Aparte de la inducción de supervivencia y proliferación, el pre-TCR dirige otro evento crucial en el desarrollo de los linfocitos T: la exclusión alélica en el locus de TCR β . Este proceso impide que, una vez se produzca un reordenamiento funcional en un alelo, la célula continúe reordenando el otro alelo. Este mecanismo restringe de forma efectiva el repertorio de los linfocitos T, puesto que impide que una célula exprese más de una cadena TCR β (Dudley *et al.*, 1994). La presencia de la cadena pT α y el pre-TCR es imprescindible para que este proceso tenga lugar (Aifantis *et al.*, 1997; von Boehmer y Fehling, 1997). Tras finalizar el proceso de proliferación, las células entran en la fase G₀ del ciclo celular, lo que permite la reexpresión de las recombinasas Rag y el inicio de los reordenamientos en el locus de TCR α , y las células (población DP, CD4⁺CD8⁺ tanto en humanos como en ratón) pasan al siguiente estadio madurativo en el que se expresa un complejo TCR $\alpha\beta$ convencional y tiene lugar la selección positiva (Kisielow y von Boehmer, 1995; Ramiro *et al.*, 1996; Trigueros *et al.*, 1998). En resumen, el resultado neto de la selección β es la generación de un elevado número de células con un único reordenamiento productivo en el locus de TCR β .

Composición bioquímica del complejo pre-TCR

La composición bioquímica del complejo pre-TCR que se muestra en la **Figura 2** es prácticamente idéntica a la del complejo TCR $\alpha\beta$, a excepción de la cadena pT α en

lugar de la cadena TCR α , tanto en ratón (Berger *et al.*, 1997) como en humanos (Carrasco *et al.*, 2001). La estructura bioquímica del pre-TCR no ha sido fácil de determinar, puesto que los niveles de expresión del pre-TCR en la superficie celular son entre 50-100 veces menores que los de un complejo TCR $\alpha\beta$ maduro. La mayor parte de los datos que se conocen sobre la participación de cada cadena particular en la función del pre-TCR proceden de estudios en ratones deficientes para uno o varios de los componentes del pre-TCR. Se sabe que tanto pT α (Aifantis *et al.*, 1997; Fehling *et al.*, 1995) como TCR β (Mombaerts *et al.*, 1992) son absolutamente imprescindibles para la selección β . Respecto a los módulos de CD3, se sabe que las cadenas CD3 ϵ (DeJarnette *et al.*, 1998; Malissen *et al.*, 1995) y CD3 γ (Haks *et al.*, 1998) se requieren para una correcta función del pre-TCR, mientras que la cadena CD3 δ , aunque se ha detectado en los complejos pre-TCR, parece dispensable para su función, al menos en ratón (Berger *et al.*, 1997; Dave *et al.*, 1997). Respecto a la asociación y función de la cadena TCR ζ , existe una mayor controversia. Aunque numerosos autores han logrado detectar la cadena TCR ζ asociada al pre-TCR (Berger *et al.*, 1997; Carrasco *et al.*, 2001; Kosugi *et al.*, 1997; Mombaerts *et al.*, 1995), otros autores no han conseguido ver esta asociación (Jacobs *et al.*, 1994). La diferencia entre las aproximaciones bioquímicas y tipos celulares usados puede explicar estas contradicciones. Aunque los estudios en ratón sugieren que la asociación de TCR ζ al pre-TCR y a pT α es más débil que a TCR α (Groettrup *et al.*, 1992; Trop *et al.*, 1999), existe una estrecha relación funcional entre el pre-TCR y TCR ζ , puesto que la activación a través del pre-TCR conduce a la fosforilación de TCR ζ y su asociación con la proteína ZAP70, de forma similar a como ocurre en el complejo TCR $\alpha\beta$ (van Oers *et al.*, 1995).

Los módulos de CD3 en el contexto del TCR $\alpha\beta$ tienen dos funciones: permitir el ensamblaje del complejo y su expresión en membrana, y transmitir la señal de reconocimiento antigénico al interior celular (Clevers *et al.*, 1988; Malissen *et al.*, 1999). Los ratones deficientes en CD3 ϵ , CD3 γ o TCR ζ no son capaces de expresar en membrana ni el complejo pre-TCR ni el complejo TCR $\alpha\beta$. Por tanto, es difícil discriminar si estas cadenas son necesarias sólo para la expresión en la superficie celular del pre-TCR, para la señalización, o para ambos procesos. En el caso de dos de estas cadenas, CD3 ϵ y TCR ζ , se ha analizado específicamente su requerimiento para la función del pre-TCR, mediante la introducción de transgenes CD3 ϵ o TCR ζ con mutaciones inhibitoras de su función en la señalización en los animales deficientes en una u otra cadena. Estos estudios han mostrado que ambas cadenas son necesarias para la expresión en membrana del pre-TCR, pero no para su función. Así, los transgenes CD3 ϵ y TCR ζ deficientes en señalización son capaces de reconstituir eficientemente los eventos dependientes del pre-TCR, como la generación de células DP, aunque no aquellos dependientes de la expresión del TCR $\alpha\beta$, como la generación de células SP

(Shores *et al.*, 1994; Sommers *et al.*, 2000). Estos datos sugieren la existencia una alta redundancia entre las distintas cadenas de CD3 en la señalización del pre-TCR, o, alternativamente, que únicamente son necesarias para la expresión en membrana, y la señalización es dependiente de otra/s molécula/s del complejo.

En los primeros estudios sobre la función del pre-TCR, se postulaba la existencia de un ligando extracelular que desencadenaría los eventos propios de la selección β (Kisielow y von Boehmer, 1995). Sin embargo, los datos disponibles en la actualidad sugieren que, en caso de existir dicho ligando, no es necesario para la función del complejo pre-TCR. Entre estos datos, destacan los obtenidos por Irving y colaboradores que mostraron que un complejo pre-TCR truncado, carente de los dominios extracelulares de pT α y de TCR β , era capaz de promover eficientemente la generación de células DP (Irving *et al.*, 1998). Actualmente, la consideración general es que el complejo pre-TCR señala de forma constitutiva (ver más adelante), y que su expresión en la membrana (Aifantis *et al.*, 2001; O'Shea *et al.*, 1997) es necesaria para desencadenar esta señalización y el proceso de selección β .

La cadena pre-TCR α

La cadena invariante pre-TCR α o pT α es una glicoproteína transmembrana de tipo I que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Presenta un único dominio extracelular que cumple la secuencia necesaria para formar un dominio de inmunoglobulinas, con las dos cisteínas implicadas en la formación del puente disulfuro intracatenario característico de este tipo de dominios. Entre el dominio de inmunoglobulinas y la zona transmembrana existe una cisteína implicada en la asociación a TCR β (**Figura 2**). El segmento transmembrana consta de 20 aminoácidos hidrofóbicos entre los que hay dos residuos polares (arginina y lisina), separados por cuatro aminoácidos, secuencia que también está presente en la cadena pT α de ratón y en las cadenas TCR α de ratón y humano, y que se ha implicado en el ensamblaje y transporte de los módulos de CD3. Finalmente, la cadena pT α humana posee un tallo citoplásmico de 114 aminoácidos, bastante enriquecido en prolinas que podrían formar sitios de reconocimiento para proteínas con dominios SH3, y con tres sitios potenciales de fosforilación por PKC (Del Porto *et al.*, 1995; Ramiro *et al.*, 1996). La identidad en la secuencia peptídica de la proteína humana completa con respecto a la de ratón es del 63%. Sin embargo, esta identidad es cercana al 80% en el dominio extracelular y transmembrana, mientras que cae abruptamente en el tallo citoplásmico. En la **Figura 3** se muestra la secuencia peptídica de la cadena pT α humana comparada con la molécula en ratón. La diferencia más llamativa entre los dominios intracelulares de pT α en ratón

y humano es su longitud, de 31 y 114 aminoácidos, respectivamente (Del Porto *et al.*, 1995; Ramiro *et al.*, 1996; Saint-Ruf *et al.*, 1994).

La expresión transcripcional de la cadena pT α está restringida al linaje T, concretamente, a los primeros estadios de la diferenciación, y no se detecta en los órganos linfoides secundarios como los nódulos linfáticos o en el bazo a nivel de RNA mensajero (Bruno *et al.*, 1995). En el proceso de desarrollo de los linfocitos T, la expresión del RNA mensajero de pT α es muy temprana, puesto que se detecta a niveles bajos en los precursores hematopoyéticos presentes en la médula ósea tanto en humanos como en ratón (Bruno *et al.*, 1995; Gounari *et al.*, 2002; Ramiro *et al.*, 1996). Aunque pT α se expresa en los precursores hematopoyéticos antes de entrar en el timo, su expresión aumenta durante el desarrollo intratímico de los linfocitos T hasta alcanzar niveles máximos de expresión en los estadios previos a la expresión del pre-TCR. En humanos, la expresión es máxima en la población CD4ISP, que precede a la aparición del pre-TCR en la membrana, y va decayendo a lo largo de la diferenciación hasta ser indetectable en las células SP (**Figura 1**) (Del Porto *et al.*, 1995; Ramiro *et al.*, 1996) (Ramiro *et al.*, 2001). En ratón, la expresión de pT α es alta en la población DN2, máxima en las poblaciones DN3 y DN4, inmediatamente antes y durante la expresión del complejo pre-TCR, y decae en las células DP, siendo indetectable en la población SP (Saint-Ruf *et al.*, 1994; von Boehmer y Fehling, 1997).



Figura 3. Alineamiento de las secuencias peptídicas de las cadenas pT α de humano (hu) y ratón (ra). Se han resaltado las secuencias ricas en prolina y los sitios potenciales de fosforilación por PKC en la secuencia de pT α humana.

A diferencia de las cadenas TCR α y TCR β , la cadena pT α presenta un largo tallo citoplasmático en el que existen sitios potenciales para la fosforilación por PKC y

motivos ricos en prolina que podrían reclutar proteínas con motivos SH3. Estas características sugirieron desde su descubrimiento un posible papel del tallo intracitoplásmico de pT α en la señalización a través del pre-TCR. Sin embargo, el hecho de que las cadenas pT α de humano y ratón tienen una baja homología en este dominio citoplásmico restó importancia a un posible papel activo de pT α en la señalización del pre-TCR. Esta posibilidad se vio apoyada por estudios que mostraron la reconstitución de la función del pre-TCR en ratones deficientes para pT α con formas de pT α parcial o totalmente carentes del dominio citoplásmico (Fehling *et al.*, 1997; Gibbons *et al.*, 2001). En el momento en el que se inició este trabajo de Tesis Doctoral los datos derivados del estudio de diferentes ratones deficientes y/o transgénicos, sugerían un mero papel estructural de la cadena pT α promoviendo la expresión de TCR β en la membrana a la espera de que se produjera el reordenamiento y la expresión de TCR α . Por tanto, la señalización a través del pre-TCR sería independiente de pT α y dependiente de los módulos de CD3.

Regulación de la expresión en membrana del complejo pre-TCR

El complejo pre-TCR tiene como una de sus funciones principales la expansión de una población clonal con un TCR β reordenado productivamente, es decir, la inducción de una alta tasa de proliferación. Esta capacidad convierte al pre-TCR en un receptor potencialmente oncogénico. De hecho, la expresión del complejo pre-TCR, junto con otros factores como Notch1 o 3 está implicada en el desarrollo de leucemias linfoblásticas agudas T (T-ALL) (Talora *et al.*, 2003; Talora *et al.*, 2006). Puesto que el pre-TCR señala una vez inducida su expresión en la membrana de forma constitutiva, la regulación de la señalización debe requerir estrictos mecanismos de control de los niveles de expresión en la superficie celular. Como ya se ha mencionado antes, el complejo pre-TCR se expresa en la membrana a unos niveles muy bajos con respecto al complejo TCR $\alpha\beta$ maduro, lo que apoya el hecho de que la expresión en membrana es un proceso altamente regulado.

La regulación de la expresión del complejo pre-TCR parece establecerse a varios niveles. En primer lugar, a nivel transcripcional. Todos los componentes del pre-TCR excepto TCR β se transcriben de forma temprana en el desarrollo T, siendo TCR β la molécula limitante para la expresión del pre-TCR (Wilson y MacDonald, 1995). Una vez se reordena funcionalmente TCR β y se forma el pre-TCR, todas las cadenas, excepto pT α , son necesarias en estadios de diferenciación posteriores para formar el TCR $\alpha\beta$. Como ya se ha mencionado anteriormente, la transcripción de pT α se regula finamente durante el desarrollo T, siendo máxima durante las etapas en las que se

expresa el complejo pre-TCR, y cayendo drásticamente en las etapas posteriores (Del Porto *et al.*, 1995; Ramiro *et al.*, 1996; Saint-Ruf *et al.*, 1994). La desaparición de los transcritos de pT α evitaría la formación de complejos pre-TCR en etapas posteriores a la selección β , que alteraría el desarrollo T (Lacorazza *et al.*, 2001). Otro nivel de regulación de la expresión en membrana parece establecerse a nivel postranscripcional, mediante el control del ensamblaje y exportación de complejos completos desde el retículo endoplásmico a la membrana celular. A este respecto, datos previos generados en nuestro laboratorio demostraron que la cadena pT α humana porta una secuencia de retención en el retículo endoplásmico en su tallo intracelular, que regula de forma parcial los niveles de expresión en la membrana celular. Por tanto, el dominio citoplásmico de la cadena pT α , al menos en humanos, podría tener un papel activo en la función del pre-TCR (Carrasco *et al.*, 2001). Finalmente, diferentes estudios sugieren que la cadena pT α podría ejercer un mecanismo de control adicional sobre la exportación de complejos y la expresión del pre-TCR. El gen codificante para pT α sufre un procesamiento alternativo del RNA que da lugar a la producción de dos isoformas de la cadena pT α , la forma pT α^a , convencional, y la isoforma pT α^b . Esta segunda isoforma, descrita tanto en humano como en ratón, carece del dominio extracelular de inmunoglobulinas, pero conserva la cisteína implicada en la unión a TCR β . Datos generados en nuestro laboratorio demostraron que esta segunda isoforma de pT α es capaz de unirse a la cadena TCR β intracelularmente, en el retículo endoplásmico, pero es incapaz de expresarse en la membrana como parte de un complejo pre-TCR competente. La isoforma pT α^b podría competir con pT α^a por la unión a TCR β , secuestrando en el retículo parte de los componentes del pre-TCR, disminuyendo así su expresión en la membrana (Ramiro *et al.*, 2001). Estos mecanismos de control, aunque contribuyen a la expresión de bajos niveles de proteína en la membrana, dejan la puerta abierta a la existencia de mecanismos de regulación adicionales.

Los niveles de expresión de un receptor en la membrana son el resultado de un equilibrio entre varios procesos, por un lado, la síntesis, ensamblaje y transporte de los componentes desde el retículo endoplásmico a la membrana, y por otro lado, la internalización, reciclaje y degradación de los mismos (**Figura 4**) (Alcover y Alarcon, 2000). Todos estos mecanismos ocurren de forma constitutiva en las células en reposo, pero uno o varios de estos procesos pueden ser alterados cuando el receptor en la membrana reconoce su ligando. En el caso del complejo TCR $\alpha\beta$, la exportación de complejos a la membrana es un proceso altamente regulado por la presencia de secuencias de retención en varias de las cadenas que lo componen, que se van enmascarando al asociarse secuencialmente las distintas cadenas, hasta conseguir su expresión completa en la membrana (Alarcon *et al.*, 2003; Delgado y Alarcon, 2005).

Sin embargo, la regulación de su expresión y su señalización se ejerce principalmente en la membrana, tras la interacción con el antígeno.

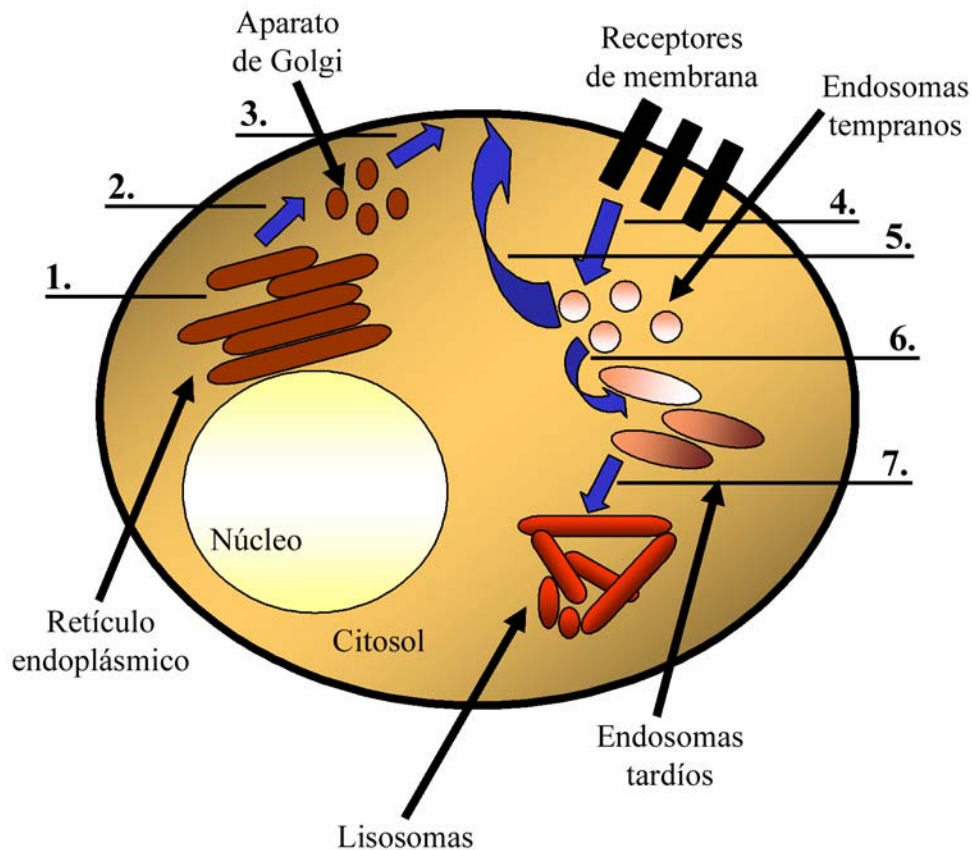


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos de transporte intracelular implicados en la expresión de receptores en membrana:

1. Síntesis de proteínas. **2.** Transporte de retículo endoplásmico al aparato de Golgi. **3.** Transporte a la membrana. **4.** Internalización. **5.** Reciclaje. **6.** Paso a endosomas tardíos. **7.** Paso a lisosomas y degradación.

En condiciones de reposo, el TCR se internaliza y recicla a la membrana de forma continua. Sin embargo, la estimulación del complejo TCR bien con anticuerpos anti-TCR o anti-CD3, con superantígenos, o con células presentadoras de antígeno y péptidos específicos, conduce a un descenso o modulación negativa de los niveles de expresión en membrana (**Figura 5**) (Alcover y Alarcon, 2000; Valitutti *et al.*, 1997), debido a que el complejo es derivado intracelularmente hacia su degradación (Liu *et al.*, 2000). Se ha propuesto que este mecanismo favorecería la interacción del TCR con moléculas señalizadoras no accesibles desde la membrana, evitaría una continua estimulación del linfocito T, y finalmente, induciría la terminación de la señal. Esta

última función tendría una gran relevancia en el contexto de la señalización a través del pre-TCR, para controlar la expresión de un receptor potencialmente oncogénico. Una gran parte del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha encaminado a la identificación de los mecanismos equivalentes que determinan el control de los niveles de expresión del complejo pre-TCR (**Figura 5**).

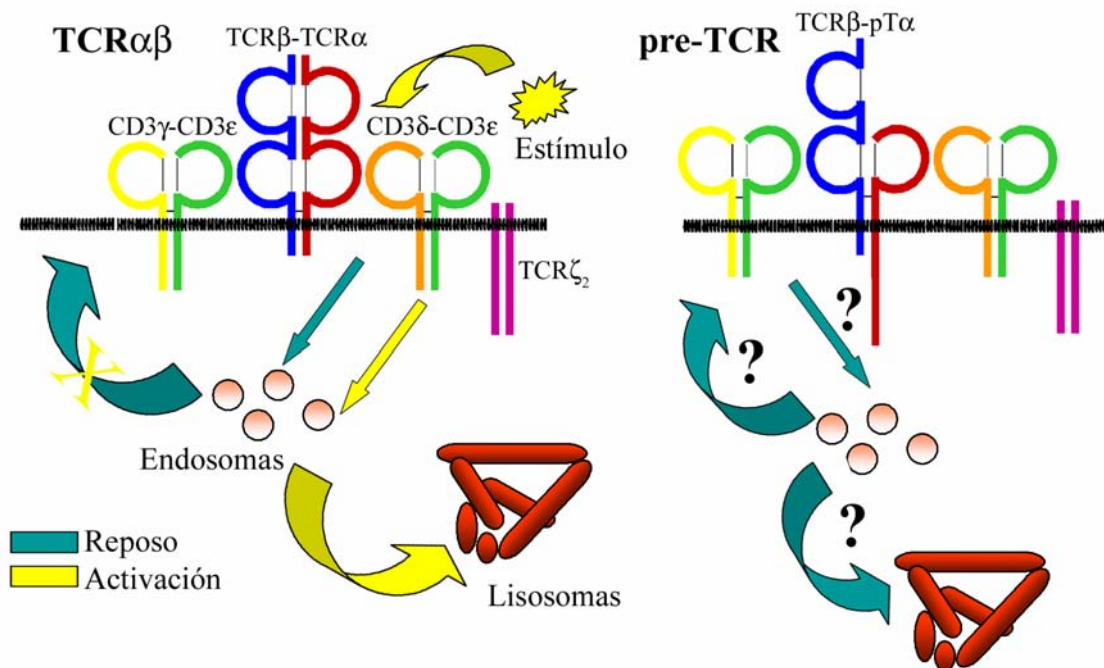


Figura 5. Esquema de los procesos de internalización, reciclaje y degradación descritos para el complejo TCR en condiciones de reposo y activación.

Inicio de la señal del pre-TCR: señalización constitutiva

Una de las propiedades más características del pre-TCR es la capacidad de señalización constitutiva de este complejo, de manera que sólo la expresión del complejo en la membrana es capaz de iniciar la señal. Por ello, uno de los campos más activos de investigación acerca del pre-TCR y la cadena pTα ha sido el estudio del inicio de la señal de este complejo. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar esta capacidad. Entre ellos, destaca el hecho de que el pre-TCR se encuentra enriquecido en la fracción de balsas lipídicas o *rafts* de forma constitutiva (Ramiro *et al.*, 2001; Saint-Ruf *et al.*, 2000), a diferencia del TCRαβ que se incluye en estas balsas lipídicas tras su estimulación (Montixi *et al.*, 1998). La presencia del pre-TCR en un entorno señalizador favorable podría ser suficiente para iniciar la cascada de señalización y se propuso que una cisteína del dominio intracelular de pTα, próxima a la membrana, podría ser palmitoilada, y, por tanto responsable de la localización autónoma de pTα en las balsas lipídicas (Saint-Ruf *et al.*, 2000). Sin embargo, datos

posteriores de los mismos autores, demostraron una reconstitución total del desarrollo T en ratones pT α -deficientes con un transgen de pT α al que se le ha eliminado esa cisteína, lo que descarta su papel en la señalización constitutiva del pre-TCR (Aifantis *et al.*, 2002). Aunque la presencia constitutiva del complejo pre-TCR en *rafts* podría ser una característica diferencial entre el pre-TCR y el TCR, otros autores proponen que la inclusión de pT α en las balsas lipídicas no es una característica específica del pre-TCR conferida por la cadena pT α , sino una propiedad intrínseca del estadio particular del desarrollo en el que se expresa este complejo (Haks *et al.*, 2003). Estos autores muestran que los complejos pre-TCR y TCR, expresados en células inmaduras, se encuentran asociados por igual en un bajo porcentaje a las balsas lipídicas. También muestran que el contenido en *rafts* de las células DN es mayor que en poblaciones en etapas posteriores del desarrollo (DP o SP), de manera que cualquier receptor, incluido un TCR $\alpha\beta$ convencional expresado durante esta etapa temprana del desarrollo, tendría la capacidad de incluirse en las balsas lipídicas y desencadenar una señalización constitutiva que mimetizaría la selección β . En este trabajo se concluye que los estadios particulares en los que se expresa el pre-TCR (DN3, DN4) tienen un umbral más bajo para la señalización, son más “sensibles”, lo suficiente como para obviar la necesidad de un ligando. Por tanto, la señalización constitutiva sería una propiedad intrínseca del estadio madurativo e independiente del complejo pre-TCR (Haks *et al.*, 2003).

En contra de esta visión, recientes estudios en los que se compara la eficiencia de TCR α y pT α en la reconstitución de ratones deficientes para pT α en condiciones equivalentes de expresión de los transgenes, demuestran claramente que TCR α no es capaz de sustituir la función de pT α en la selección β , principalmente en términos de inducción de la proliferación (Borowski *et al.*, 2004). Datos más recientes muestran que en el dominio extracelular de pT α existen residuos cargados, conservados en las cadenas de humano y ratón, que están implicados en la oligomerización espontánea del complejo pre-TCR en la membrana. La introducción de un transgen para pT α con esos residuos mutados sobre un fondo deficiente en pT α no reconstituye ni el número de timocitos total ni el porcentaje de la población DP, lo que demuestra que estos aminoácidos son imprescindibles para la función del pre-TCR (Yamasaki *et al.*, 2006). Estos resultados, en contra de los datos iniciales que indicaban que el dominio extracelular de pT α era dispensable para su función (Irving *et al.*, 1998), prueban claramente que la cadena pT α presenta una capacidad exclusiva de oligomerización espontánea, responsable de la señalización constitutiva a través del complejo pre-TCR.

La señalización a través del complejo pre-TCR

La mayor parte de la información sobre los mecanismos moleculares concretos que participan en la señalización del complejo pre-TCR procede de datos obtenidos a partir del estudio de ratones deficientes o transgénicos para distintas proteínas. Se conoce la implicación de las familias de Src-quinasas (Lck y Fyn) (Groves *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2000) y Syk-quinasas (Syk y ZAP70) (Cheng y Chan, 1997; Cheng *et al.*, 1997), así como de los adaptadores LAT y SLP76 (Pivniouk *et al.*, 1998). La activación por el pre-TCR también induce aumentos intracelulares en la concentración de calcio que se requieren para la activación de los factores de transcripción NFAT y NF- κ B, ambos necesarios en la supervivencia inducida por el pre-TCR (Aifantis *et al.*, 2001; Voll *et al.*, 2000). En conjunto, la mayor parte de las vías de activación implicadas en la señalización del pre-TCR son comunes al complejo TCR, apoyando el punto de vista generalizado de que esta señalización depende mayoritariamente del complejo CD3. Sin embargo, el tamaño del dominio intracelular y la existencia en el mismo de regiones de posible relevancia funcional (**Figura 3**), junto con nuestros datos sobre la función de este dominio en la regulación de la expresión del complejo pre-TCR (Carrasco *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2001), fueron los criterios considerados para profundizar en el estudio de la posible implicación del tallo de pT α en la señalización del pre-TCR. Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral han aparecido nuevos datos que corroboran nuestra hipótesis e implican de forma activa al tallo intracitoplásmico de pT α en la transducción de señales. Estos datos, derivados de ratones deficientes en pT α , en los que se introduce un transgen para pT α que carece parcial o totalmente del tallo citoplásmico mostraron que la ausencia de los dominios ricos en prolinas provoca un defecto en el desarrollo de los linfocitos T. En estos animales, aunque se promueve la generación de células DP, los números están disminuidos con respecto a los animales portadores de una cadena pT α completa. Además, las células que se generan presentan defectos en proliferación y una alta tasa de apoptosis. Los autores de este trabajo concluyen que el dominio citoplásmico de pT α es importante en la función del pre-TCR también en ratón, y sugieren la posible existencia de ligandos intracelulares para la cadena pT α (Aifantis *et al.*, 2002; Borowski *et al.*, 2004). Esta interpretación se opone a los datos iniciales generados por el mismo grupo, que indicaban que el dominio intracelular de pT α era prescindible para la función del pre-TCR (Fehling *et al.*, 1997; Gibbons *et al.*, 2001). La explicación para congeniar ambos resultados es que el elevado número de copias del transgen deficiente en el dominio citoplásmico en los animales analizados en los estudios iniciales (hasta 50 veces mayor que los niveles endógenos de pT α) habría enmascarado las deficiencias debidas a la ausencia del dominio intracelular.

Los estudios más recientes aportan cada vez más datos acerca de la función específica de la cadena pT α durante el desarrollo T. Aunque inicialmente se había propuesto que la cadena TCR α podía sustituir a pT α en su función (Haks *et al.*, 2003), reforzando la hipótesis general de que pT α carece de propiedades señalizadoras, recientemente se ha visto que TCR α sólo mimetiza parcialmente la señalización a través de pT α (Borowski *et al.*, 2004; von Boehmer, 2005). Por lo tanto, la cadena pT α debe presentar capacidades de señalización únicas, no compartidas con TCR α ni con los módulos de CD3, que son fundamentales para el correcto desarrollo de los linfocitos T.

La posible existencia de mecanismos de señalización específicos dependientes de la cadena pT α no ha sido establecida hasta el momento. De hecho, no se ha identificado ningún ligando intracelular de la cadena pT α . No obstante, y a pesar de la escasa homología entre las regiones intracelulares de pT α en humano y ratón, ambas moléculas presentan en el dominio intracelular un motivo rico en prolinas parcialmente conservado (único en el pT α humano y duplicado en el pT α de ratón, Pro3, **Figura 3**) que comparte cierta homología con un motivo rico en prolinas presente en la molécula coestimuladora CD2 (Aifantis *et al.*, 2002; Hayday *et al.*, 1999). En el transcurso de este trabajo de Tesis Doctoral, hemos identificado varios motivos adicionales ricos en prolinas en el dominio citoplásmico de pT α humano. Uno de ellos cumple la secuencia consenso atípica descrita recientemente para la unión de los dominios SH3 de la familia de proteínas adaptadoras Cin85/CMS (Pro2, **Figura 3**) (Dikic, 2002; Kowanetz *et al.*, 2003; Kurakin *et al.*, 2003). Este motivo también está presente en el dominio citoplásmico de CD2, que también interacciona con esta familia de proteínas, pero no parece estar presente en el tallo intracelular de la cadena pT α de ratón (Dustin *et al.*, 1998; Tibaldi y Reinherz, 2003).

Las proteínas Cin85 y CMS comparten una estructura similar, con tres dominios SH3 en su extremo amino terminal (N-terminal), una región central con motivos ricos en prolinas y una región *coiled-coil* en el extremo carboxilo terminal (C-terminal). Los dominios SH3 interaccionan con una gran cantidad de proteínas que presentan el motivo de unión específico para esta familia de adaptadores, como CD2, c-Cbl y Cbl-b, BLNK o Alix. La región rica en prolinas recluta proteínas con dominios SH3, como la subunidad reguladora p85 de la PI3-quinasa, Grb2, Src-quinasas o las endofilinas. Finalmente, el dominio *coiled-coil* está implicado en homo- y heterodimerización entre los distintos miembros de la familia (Dikic, 2002). Por tanto, muchas de las proteínas con las que interaccionan los miembros de la familia Cin85/CMS forman parte de la cascada de señalización que se sabe que desencadena el TCR $\alpha\beta$ y, presumiblemente, el pre-TCR.

La familia Cin85/CMS está implicada en numerosos procesos celulares. Entre ellos, el más estudiado es la internalización y degradación de distintos receptores

tirosina-quinasa de membrana, como los receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el derivado de plaquetas (PDGFR) o el de hepatocitos (c-Met), o receptores de citoquinas como c-kit (Dikic, 2002; Petrelli *et al.*, 2002; Soubeyran *et al.*, 2002). Dentro del sistema inmune, la mayor parte de los datos disponibles sobre la función de esta familia de proteínas se refieren a la proteína CMS o su homólogo en ratón, la proteína CD2AP (CD2 *Associated Protein*), que recibe su nombre por su capacidad de unirse al tallo citoplásmico de CD2 (Dustin *et al.*, 1998). Esta unión es responsable de la organización de la sinapsis inmunológica, y del reclutamiento de centro organizador de microtúbulos durante la activación del TCR (Dustin *et al.*, 1998; Zaru *et al.*, 2002). Los ratones deficientes para CD2AP mueren tempranamente debido a fallos renales, puesto que esta proteína también está implicada en la arquitectura y función de los glomérulos (Shih *et al.*, 1999). Al analizar los linfocitos T periféricos de estos animales, se ha visto que son incapaces de promover la modulación negativa de los niveles de expresión del TCR en membrana tras su activación, puesto que presentan un defecto en la degradación del complejo TCR. Esto provoca un fenotipo de hiperactivación de los linfocitos T (Lee *et al.*, 2003). Por tanto, los datos disponibles indican que estas proteínas regulan tanto la señalización como los niveles de expresión en membrana de distintos receptores, entre ellos el TCR. La presencia de un motivo consenso para su unión en el dominio citoplásmico de pT α sugiere que la familia de proteínas adaptadoras Cin85/CMS podrían ser candidatos adecuados para controlar la señalización constitutiva del complejo pre-TCR, por lo que uno de los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido establecer la posible relevancia de esta familia de proteínas como adaptadores intracelulares de la molécula pT α humana y determinar su funcionalidad en el proceso de señalización a través del pre-TCR.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Este trabajo de tesis doctoral ha tenido como principal objetivo el estudio de la dinámica de la expresión y la estabilidad en la membrana del complejo pre-TCR humano, y, en particular, la identificación de los mecanismos moleculares que regulan su expresión y función. Teniendo en cuenta los datos previos del laboratorio, nuestro estudio se ha centrado en la función específica que desempeña el dominio citoplásmico de la cadena pT α en dichos procesos. Los objetivos concretos de este trabajo han sido:

1. Estudio de los mecanismos moleculares que regulan la expresión en membrana del complejo pre-TCR humano: dinámica de los procesos de internalización y destino intracelular del complejo pre-TCR humano e implicación del dominio citoplásmico de la cadena pT α en dichos procesos.
2. Identificación de adaptadores moleculares de la cadena pT α : caracterización de la familia de proteínas Cin85/CMS como ligandos intracelulares de la cadena pT α y como adaptadores de la señalización a través del complejo pre-TCR humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares

La línea celular pre-T humana SupT1 (Reynolds *et al.*, 1987) y la línea T humana JR3.11 (deficiente en TCR α derivada de la línea Jurkat) (Arnaud *et al.*, 1997), así como las líneas derivadas de las mismas (transfectantes transitorios, estables o células transducidas con retrovirus), se cultivaron en medio RPMI (Biowhitaker) suplementado con 10mM Hepes y 10% FBS (suero fetal bovino, Gibco). Las líneas COS7 y Phoenix *ampho* (cedida por Dr. N. Taylor) se cultivaron en RPMI 10% FBS.

2. Citometría de flujo

Los anticuerpos primarios y secundarios usados para técnicas de citometría de flujo se describen en las **Tablas I y II**, respectivamente. Para las tinciones de membrana, las células se incubaron con los anticuerpos en cantidades saturantes en PBS 1% FBS, 1% BSA y 0,01% azida sódica durante 20 minutos a 4°C en el caso de los anticuerpos primarios directamente acoplados a fluorocromo. En el caso de las tinciones indirectas, tras la incubación con el anticuerpo primario, las células se lavaron y se incubaron en el mismo medio con el anticuerpo secundario durante 20 minutos a 4°C. Para las tinciones intracelulares, las incubaciones se hicieron de la misma manera en presencia de un agente permeabilizante (0,5% de saponina, Sigma). Los controles negativos para discriminar la autofluorescencia de las células se determinaron con anticuerpos de ratón irrelevantes del mismo isotipo que los específicos, o suero pre-inmune de ratón o conejo seguido de anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromo para las tinciones intracelulares. Tras las incubaciones, se lavó el exceso de anticuerpo libre y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS-XL (Beckman Coulter) o FACSCalibur (Beckton Dickinson).

Tabla I. Anticuerpos primarios.

Especificidad	Clon/Isotipo	Conjugado	Fuente
CD3 ϵ	UCHT1/IgG1	-	BD Biosciences
CD3 ϵ	UCHT1/IgG1	APC	BD Biosciences
CD3 ϵ	UCHT1/IgG1	PE	BD Biosciences
CD3 ϵ	SP34/IgG3	-	BD Biosciences
CD4	HP26/IgG2a	-	(Carrera <i>et al.</i> , 1987)
CD4	13B8.2/IgG1	PC5	Immunotech

CD8	G42-8/IgG2a	FITC	BD Biosciences
CD63	Tea3/18.1/	-	(Penas <i>et al.</i> , 2000)
pTα	K5G3/IgG2a	-	(Ramiro <i>et al.</i> , 2001)
pTα suero conejo	CT/Conejo	-	(Carrasco <i>et al.</i> , 2001)
TCRβ	βF1/IgG1	-	ATCC
TCRβ	JOV11/IgG2a	-	Ancell
TCRζ	448/Conejo	-	(Sahuquillo <i>et al.</i> , 1998)
TCRαβ	BMA031/IgG2b	-	Immunotech
TCRαβ	BMA031/IgG2b	PE	Immunotech
TCRαβ	BMA031/IgG2b	PC5	Immunotech
α-tubulina	DM 1A/IgG1	-	Sigma
Flag	M2/IgG1	-	Sigma
Flag	M2/IgG1	Peroxidasa	Sigma
Calnexina	Suero conejo	-	Stressgen
Manosidasa II	Suero conejo	-	Chemicon
EEA1	14/IgG1	-	BD Biosciences
Lamp1	H4A3/IgG1	-	BD Biosciences
Faloidina		TRITC	Sigma

Tabla II. Anticuerpos secundarios.

Especificidad	Conjugado	Origen	Fuente
IgG1 ratón	FITC	Cabra	SouthernBiotech
IgG2a ratón	FITC	Cabra	SouthernBiotech
IgGs ratón F (ab') ₂	PE	Cabra	SouthernBiotech
IgG1 ratón	PE	Cabra	SouthernBiotech
IgGs conejo F (ab') ₂	PE	Cabra	SouthernBiotech
IgGs ratón	APC	Cabra	BD Biosciences
IgG1 ratón	Alexa647	Cabra	Invitrogen
IgGs ratón	Alexa594	Cabra	Invitrogen
IgGs conejo	Alexa594	Cabra	Invitrogen

IgGs ratón	Alexa555	Cabra	Invitrogen
IgG1 ratón	Alexa555	Cabra	Invitrogen
IgG1 ratón	TxR	Cabra	SouthernBiotech
IgGs ratón	-	Conejo	DAKO
FITC	Alexa488	Cabra	Invitrogen
IgGs ratón	Biotina	Cabra	Invitrogen
Estreptavidina	APC		Caltag
Estreptavidina	Peroxidasa		MP Biomedicals
IgGs ratón	Peroxidasa	Cabra	Jackson Immunoresearch

3. Construcciones

Las construcciones usadas en este trabajo se obtuvieron mediante técnicas convencionales de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) y subclonaje. Las secuencias de los oligonucleótidos usados para realizar las construcciones se muestran en la **Tabla III**.

El DNA codificante (cDNA) para TCR α V α 12.1 fue cedido por el Dr. JA. López de Castro (Barber *et al.*, 1995). La construcción quimérica TCR ζ -GFP se obtuvo por amplificación por PCR con los oligonucleótidos 351 y 352 a partir del cDNA completo de TCR ζ , cedido por el Dr. B. Alarcón (San Jose *et al.*, 2000), para eliminar el codón de parada. El producto de esta PCR se subclonó en la diana *SmaI* del vector pEFGP-N1 (Clontech) en fase con la proteína GFP.

3.1 Construcciones de pT α

La construcción TCR α -pT α se obtuvo amplificando el cDNA para TCR α V α 12.1 con los oligonucleótidos TCR α V α 12.1 y 253 (región extracelular) y el cDNA para pT α obtenido en nuestro laboratorio (Ramiro *et al.*, 1996) con los oligonucleótidos 252 y 368 (región transmembrana e intracelular). Ambos fragmentos se clonaron entre las dianas *BamHI/XhoI* del vector pCDNA3-Flag en fase entre ellos y con el epítipo Flag.

La proteína de fusión de la enzima glutatión S-transferasa a pT α (GST-pT α) se obtuvo mediante amplificación con los oligonucleótidos 353 y 354 (dominio citoplasmático) del cDNA completo de pT α . El producto se clonó entre las dianas *BamHI/XhoI* del vector pGEX-4T1 (Amersham Biosciences). Las fusiones a GST de los mutantes de delección de pT α se obtuvieron mediante PCR: oligonucleótidos 353-421 y 420-354 para la construcción GST-pT α Δ Pro2, y oligonucleótidos 353-397 y 398-354

para la construcción GST-pTαΔPro3, usando como molde el cDNA completo de pTα. Los fragmentos se clonaron entre las dianas *BamHI/XhoI* del vector pGEX-4T1. La construcción GST-pTαΔPro5 se obtuvo mediante la digestión de GST-pTα con *BamHI/BglII*, usando una diana *BglII* natural de pTα, y se subclonó en la diana *BamHI* del vector pGEX-4T3 (Amersham Biosciences).

La construcción pTαwt-Flag se realizó mediante amplificación por PCR a partir del cDNA completo de pTα con los oligonucleótidos 242 y 368, para eliminar el codón de parada, y subclonaje en las dianas *BamHI/XhoI* del vector pCDNA3-Flag en fase con el epítipo Flag. Para construcción de pTα completo con la delección del motivo Pro2 (pTαΔPro2-Flag), el cDNA de pTα se amplificó con dos parejas de oligonucleótidos, 242-421 y 420-368. Los dos fragmentos se clonaron en las dianas *BamHI/XhoI* del vector pCDNA3-Flag. Estas construcciones (pTαwt-Flag y pTαΔPro2-Flag) se amplificaron con los oligonucleótidos 495 y 496 para subclonarlas en la diana *EcoRI* del vector retroviral MigR1.1 (cedido por Dr. JC. Aster).

En la **Figura 6** se muestra un esquema de la zona de hibridación aproximada de los oligonucleótidos usados para las construcciones de TCRα y pTα.

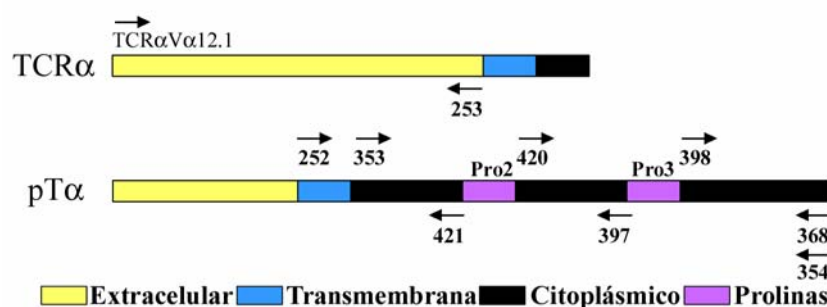


Figura 6. **Representación esquemática de las proteínas TCRα y pTα.** Las flechas indican la posición de hibridación aproximada de los oligonucleótidos utilizados para generar las distintas construcciones.

3.2 Construcciones de Cin85 y CMS

Los cDNAs para las proteínas Cin85, CMS y CD2BP3 se obtuvieron mediante PCR usando cDNA de timo total como molde con los oligonucleótidos 393-384 para amplificar Cin85, 355-365 para amplificar CMS y 411-384 para CD2BP3, y se clonaron entre las dianas *BamHI/XhoI* del vector pCDNA3-Flag (para obtener las construcciones Cin85-Flag, CMS-Flag y CD2BP3-Flag) o del vector pCDNA3-HA (para la construcción Cin85-HA). A partir de estos cDNAs se hicieron las diferentes construcciones usando la siguiente combinación de oligonucleótidos, que también se clonaron entre las dianas *BamHI/XhoI* del vector pCDNA3-Flag:

Construcción	Pareja de oligos	Construcción	Pareja de oligos
Cin85-SH3 ABC	393-382	CMS-SH3 ABC	355-413
Cin85-SH3 AB	393-412	CMS-SH3 AB	433-434
Cin85-SH3 BC	411-382	CMS-SH3 BC	435-436
Cin85-SH3C-Pr-Cc	386-384	CMS-Pr-Cc	414-365
Cin85-Pr-Cc	383-384		

En la **Figura 7** se muestra un esquema de la zona de hibridación aproximada de los oligonucleótidos usados en este apartado.

Para las construcciones quiméricas de fusión a GFP, el cDNA de CMS se amplificó con las parejas de oligonucleótidos 491-492 para el CMS completo, 491-493 para la construcción SH3-ABC y 494-492 para la construcción CMS-Ct. Los fragmentos se clonaron entre las dianas *XhoI/BamHI* del vector pEGFP-N1 en fase la proteína GFP. Todas las construcciones generadas en este estudio se han sido comprobadas mediante secuenciación.

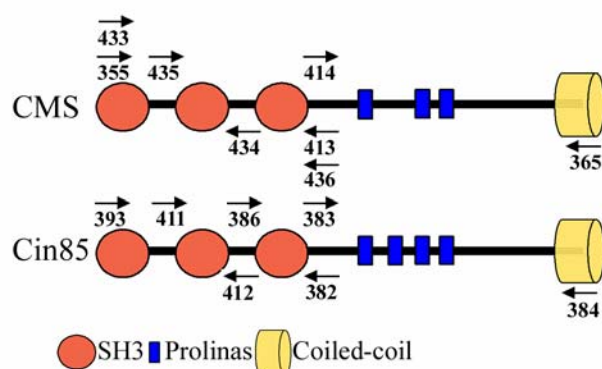


Figura 7. Representación esquemática de las proteínas Cin85 y CMS. Las flechas indican la posición de hibridación aproximada de los oligonucleótidos utilizados para generar las distintas construcciones

Tabla III. Lista de oligonucleótidos.

Nº	Especificidad	Secuencia (5'→3')
63	TCRα 5' interno	GAACCCTGACCCTGCCGTGTACC
242	pTα 5' externo	GGGCCCGGATCCATATGGCCGGTACATGGCTG
252	pTα 5' interno	CGGAATTCTGTGGCTGGGGGTCCTGCG
253	TCRα 3' interno	CGGAATTCGGTTTTGAAAGTTTAGGTTTCG
259	β-actina 3' interno	GCATGGAGTCCTGTGGCATCCACG
260	β-actina 5' interno	GGTGTAACGCAACTAAGTCATAG
334	TCRα 3' externo	GGGGGATCCCCGCTGGACCACAGCCGCAG

351	TCR ζ 5' externo	CGCGCGCCCGGGATGAAGTGGAAGGCGCTT
352	TCR ζ 3' externo	GCGCGCCCGGGCCCCGCGAGGGGGCAGGGC
353	pT α 5' interno	GCGGATCCTTACCTGCAGCTGCCTGTGCGACCCC
354	pT α 3' externo	GTCGACTCAGGCAGCTCCAGCCTGCAGAG
355	CMS 5' externo	GGAATTCATGGTTGACTATATTGTGGAGTAT
365	CMS 3' externo	CTCGAGAGAAGACAGGACAGCTTTTTT
368	pT α 3' externo	CTCGAGGGCAGCTCCAGCCTGCAGAGG
382	Cin85 3' interno	CCGCTCGAGTGGAAGTAACTTCACGAAGTT
383	Cin85 5' interno	CCGGGATCCCTTATGGTGCCCAAGAAGCCACCGCC T
384	Cin85 3' externo	CCGCTCGAGTTTTGATTGTAGAGCTTTCTT
386	Cin85 5' interno	CGGGGATCCCTTATGGTGAAGGATTACTGCAAAGT AATATTT
393	Cin85 5' externo	CGGGATCCCTTATGGTGGAGGCCATAGTGGAG
397	pT α 3' interno	GGTGTACCCCCAGCGGCGGT
398	pT α 5' interno	CCTGGGAGCCCAGTATGGGGGGA
411	Cin85 5' interno	GGATCCTATGGCCTGCCAGGTGGCATTTCAGCTAC
412	Cin85 3' interno	CTCGAGCAGCTCCTTGATGAAGTTGGAAGG
413	CMS 3' interno	CTCGAGAAGTTCATTTATCTGGACAGCAAAATTG
414	CMS 5' interno	GGATCCTATGGATAAAGACTTTCCAAAACCA
417	CMS 5' interno	GGATCCTATGGGTAAAGAAGGAGTATTTC
420	pT α 5' interno	GATCGGCGCTGGGGTGACACC
421	pT α 3' interno	GCTGGTGGCCTCTCGTCC
433	CMS 5' externo	CGGGATCCCTTATGGTTGACTATATTGTGGAGTAT
434	CMS 3' interno	CCGCTCGAGTACCTCTAATTCTTTCACAAAATTTGA GGG
435	CMS 5' interno	CGGGATCCCTTATGGTTAAGCGTCAGTGTAAGTT CTTTTTG
436	CMS 3' interno	CCGCTCGAGTTTATCAAGTTCATTTATCTGGAC
491	CMS 5' externo	GGCTCGAGATGGTTGACTATATTGTGGAG
492	CMS 3' externo	GGGATCCCCAGAAGACAGGACAGCTTTTTT
493	CMS 5' interno	GGGATCCCCAAGTTCATTTATCTGGACAGC

494	CMS 3' interno	GGCTCGAGTATGGGTAAAGAAGGAGTATT
495	pTα 5' externo	GCGAATTCATGGCCGGTACATGGCTGCTA
496	Flag 3' externo	GCGAATTCCTAGACTTGTCATCGTCGTCC
TCRα Vα12.1	TCRα 5' externo	ATGGATCCTCTAGATGATTTTTTGCCAGCCTGTTG

4. Transfecciones transitorias y obtención de transfectantes estables

La línea SupT1 se transfectó transitoriamente por electroporación con 60 µg del vector de interés en 500 µl de RPMI 20% FBS, a 264V y 975µF en un electroporador Gene Pulser II (BioRad). Las células electroporadas se pusieron en cultivo en RPMI 10% FBS hasta el tiempo de análisis. Para la obtención de transfectantes estables, las células se electroporaron a 250V y 975µF. Tras dos días en cultivo, las células se repartieron en placas de 96 pocillos, a razón de 20.000 células por pocillo en presencia de 1mg/ml de geneticina (Gibco). Los pocillos en los que se observó crecimiento celular se analizaron por citometría de flujo para detectar la proteína de interés (GFP en el caso de los transfectantes SupT1-TCRζ-GFP, y con anticuerpos anti-TCRαβ en el caso de los transfectantes SupT1-TCRαβ y -TCRα/pTα). La línea COS7 se transfectó por electroporación con 5 µg del DNA de interés y 20µg de DNA *carrier* a 200V y 975µF, en 200ml de RPMI 20% FBS. En el caso de la cotransfección con Cin85, CMS y CD2BP3, las células se transfectaron de la misma manera con las cantidades indicadas de DNA.

5. Producción de sobrenadantes retrovirales y transducción de la línea JR3.11

Para la producción de sobrenadantes retrovirales, la línea empaquetadora Phoenix-*ampho* se transfectó mediante electroporación (20µg DNA, a 220V y 975 µF) con las construcciones pTαwt-Flag o pTαΔPro2-Flag clonadas en el vector bicistrónico con GFP MigR1.1 ó con el vector vacío. 24 horas después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes en RPMI 10% FBS (en tres rondas de 10-16 horas), se filtraron por filtros de 0,8µm (Sartorius) y se usaron para transducir la línea JR3.11. Las células JR3.11 se plaquearon en pocillos pretratados con fibronectina (50µg/ml, Takara) en RPMI 20% FBS y se añadió el sobrenadante retroviral en relación 2:1 con el medio en el que están resuspendidas las células. Las placas se centrifugaron a 1800 rpms durante 30 minutos a temperatura ambiente y se dejaron en cultivo entre 10-16 horas. Tras este tiempo, se retiró el medio y se puso sobrenadante fresco. Este proceso se repitió hasta completar tres rondas de transducción. Después de una semana en cultivo, las células GFP⁺ se seleccionaron usando un separador celular FACSVantage SE (BD Biosciences).

6. Cinéticas de expresión en membrana por citometría de flujo

Las células SupT1 salvajes o transfectantes estables cultivadas en RPMI suplementado con 10% FBS se trataron con cicloheximida (40µg/ml, Calbiochem) o brefeldina A (1µg/ml, Sigma) o se dejaron sin tratar. A los distintos tiempos se analizó la expresión en membrana o intracelular de la proteína de interés mediante citometría de flujo. El porcentaje de expresión en membrana en cada punto de análisis se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{MFI (células tratadas)} - \text{MFI control (células tratadas)}}{\text{MFI (células no tratadas)} - \text{MFI control (células no tratadas)}} \times 100$$

MFI = media de la intensidad de fluorescencia

Control = control negativo de autofluorescencia

En el caso de las cinéticas en presencia de PP2 (inhibidor de la actividad de Src-quinasas) o de citocalasina D (inhibidor de la polimerización del citoesqueleto), estas drogas se usaron a 2,5 µM en el caso de PP2 (Calbiochem) y 9,8 µM para la citocalasina D (Calbiochem). En las internalizaciones de anticuerpos desde la membrana, para hallar el porcentaje de anticuerpo remanente en la membrana se usó la fórmula:

$$\frac{\text{MFI (tiempo x)} - \text{MFI control (tiempo 0)}}{\text{MFI (tiempo 0)} - \text{MFI control (tiempo 0)}} \times 100$$

7. Microscopía confocal

Para los análisis por microscopía confocal, las células en estudio se depositaron sobre cubreobjetos preincubados con 20 µg/ml de Poli-L-Lisina (Sigma), se incubaron 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 1 minuto a 300 rpms, también a temperatura ambiente. Después, las células se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en PBS 4% de paraformaldehído y 0,03M de sacarosa. Tras la fijación, se bloqueó la posible autofluorescencia de las células con una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente en PBS 50mM NH₄Cl. Para las tinciones intracelulares, los cristales se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos primarios en PBS 1% BSA 0,05% Saponina, se lavaron en ese mismo tampón y se incubaron 45 minutos con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a fluorocromo en el mismo tampón. Para las tinciones de superficie, las tinciones se llevaron a cabo de forma similar, pero en ausencia de saponina.

Las tinciones se analizaron en un Confocal Radiance 2000 (BioRad) acoplado a un microscopio invertido Axiovert S100 TV (Zeiss). Las imágenes se tomaron con un objetivo de aumento 63X, en secciones consecutivas de aproximadamente 1 μ m de grosor. Para cuantificar la colocalización en las muestras se usó el programa Metamorph 6.1r6 (Universal Imaging). Se analizó la colocalización de pT α con los endosomas tempranos y con los lisosomas sección por sección de cada célula. Se consideró la colocalización de cada célula individual como la media entre las secciones en las que se observa tinción para los dos marcajes analizados. Se cuantificaron entre 10 y 40 células por experimento y condición, obteniéndose la media del experimento como el sumatorio de la colocalización de todas las células analizadas dividido entre el número de células analizadas (n) y la desviación estándar (SD).

Las células SupT1 transfectadas transitoriamente con CMS-GFP, SH3-ABC-GFP o Ct-GFP se recogieron tres horas después de la transfección y se sometieron a un gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Atom) para eliminar las células muertas durante la transfección, antes de proceder a su activación y/o tinción. Para la activación con bolas magnéticas anti-CD3 (Dyna), las células se mezclaron en relación 1:1 con las bolas en RPMI y se incubaron directamente a 37°C durante 5 o 15 minutos, tras los cuales se procedió a su fijación y tinción.

8. Internalización de la cadena pT α

Las células SupT1, sin tratar o pretratadas con PP2 o citocalasina D, se incubaron durante 15 minutos a 37°C en RPMI con el anticuerpo monoclonal anti-pT α (K5G3), generado contra el dominio extracelular de pT α (**Tabla I**). Después, las células se lavaron en RPMI atemperado para eliminar el anticuerpo que no ha entrado dentro de las células. La mitad de las células se depositó sobre un cubreobjetos (y se procedió a su fijación y tinción) y la otra mitad de las células se puso de nuevo a 37°C durante 15 minutos adicionales, tras los cuales se depositaron sobre un cubreobjetos y se procedió a su fijación y tinción.

Para los timocitos pre-TCR⁺ aislados ex vivo, se procedió de manera similar, pero con incubaciones de 15 y 30 minutos a 37°C con el anticuerpo anti-pT α presente en todo momento. En el caso de las células SupT1 transfectadas transitoriamente con CMS-GFP, las células se recogieron tres horas después de la transfección y se sometieron a un gradiente de Ficoll-Hypaque para eliminar las células muertas durante la transfección. Después se procedió a su marcaje con anti-pT α como se ha explicado anteriormente.

9. Aislamiento *ex vivo* de poblaciones de células pre-T

Las muestras de timo postnatal humano se obtuvieron durante operaciones de cirugía cardíaca correctiva en pacientes normales de entre 15 días y 5 años de edad. Tras la disgregación de los fragmentos tímicos, la suspensión de timocitos humanos se sometió a una centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque para eliminar hematíes y células muertas.

Para el aislamiento de la población pre-T intratímica que expresa el complejo pre-TCR, los timocitos se fraccionaron por centrifugación en gradientes de densidad discontinuos de Percoll (Amersham Biosciences). Los timocitos aislados de la fracción con densidad 1.068, caracterizados previamente como timocitos grandes, incluyen la población pre-TCR⁺ (Carrasco *et al.*, 1999; Ramiro *et al.*, 1996). Para aislar esta población sin activar el receptor pre-TCR que se expresa en la membrana, se recurrió al enriquecimiento de la población pre-TCR⁺ mediante la eliminación de las células TCRαβ⁺ presentes en la fracción de timocitos grandes. Las células se trataron con anti-TCRαβ-PE seguido de esferas magnéticas acopladas a anti-PE (Microbeads, Miltenyi Biotec). Las células se seleccionaron negativamente en columnas de selección magnética automáticas (AutoMacs, Miltenyi Biotec). Mediante este método, la población seleccionada negativamente se enriquece en un 60-80% en células pre-TCR⁺, no seleccionándose contaminantes CD3⁺ TCRαβ⁺. Los aislamientos de las poblaciones de timocitos para los análisis mediante *Northern-Blot* se llevaron a cabo como se ha descrito previamente mediante selección inmunomagnética (García-Peydro *et al.*, 2003; Trigueros *et al.*, 1998).

10. Inmunoprecipitaciones

Para detectar las proteínas pTαwt-Flag, pTαΔPro2-Flag y TCRα/pTα-Flag, tras las incubaciones en presencia de cicloheximida las células se lavaron una vez en PBS, se lisaron en tampón de lisis (TrisHCl 10 mM pH 7.6, NaCl 150mM) con 1% Tritón X-100 más inhibidores de proteasas (1mM PMSF, y 1μg/ml leupeptina, aprotinina y pepstatina, todos de Sigma), inhibidores de fosfatasa (50 mM NaF y 1mM Na₃VO₄) e iodo-acetamida (10 mM, Calbiochem), durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 13.000 rpms durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se preaclaron dos veces con proteína G-Sefarosa (Sigma) durante 1 hora y una tercera vez con proteína G-Sefarosa preincubada con inmunoglobulinas de suero de ratón o de conejo, según el origen del anticuerpo que se use durante la inmunoprecipitación. Finalmente, los lisados se inmunoprecipitaron con el anticuerpo de interés acoplados a proteína G-Sefarosa desde 3 hasta 12 horas. Los inmunoprecipitados se lavaron 5 veces en tampón de lisis con detergente y se resuspendieron en tampón de carga, se

resolvieron en geles de archilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturizantes (*SDS-PAGEs*) del 12 o 10% y se detectaron mediante *Western-Blot*.

Para la coimmunoprecipitación de CMS y pT α , las células SupT1 transfectadas transitoriamente con CMS-Flag se lisaron en tampón de lisis 1% Brij96V (Fluka) y 60 mM N-Octyl- β -D-glucopiranosido (Sigma) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y se procedió a su inmunoprecipitación.

11. Marcaje de proteínas de membrana con biotina

Las células SupT1 se lavaron 2 veces en PBS antes de incubarlo con 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-biotina (Pierce) en PBS 1mM MgCl₂ y 0,1 mM CaCl₂ durante 1 hora a 4°C con agitación suave. El exceso de biotina se eliminó lavando las células 3 veces en PBS antes de ponerlas en cultivo. Las células se cultivaron en RPMI 10% FBS en ausencia o presencia de cloroquina (50 μ M, Sigma), lactacistina (20 μ M, Sigma) o epoxomicina (1 μ M, Calbiochem). A las 6 horas, las células se recogieron, se lavaron y se lisaron en tampón de lisis 1% Brij96V, en presencia de los inhibidores de proteasas y fosfatasas descritos anteriormente durante 45 minutos a 4°C. Los lisados se centrifugaron a 13.000 rpms durante 40 minutos a 4°C. A los sobrenadantes se les añadió BSA a 200 μ g/ml para eliminar fondo de biotina libre, y se preacclararon como se describe en el apartado anterior con proteína A-Sefarosa y se inmunoprecipitaron con anti-CD3 ϵ (SP43). Los inmunoprecipitados se lavaron 6 veces en tampón de lisis, y se resuspendieron en tampón de carga. Las proteínas precipitadas se resolvieron en *SDS-PAGEs* del 12% en condiciones no reductoras y se detectaron mediante técnicas de *Western-Blot* con avidina acoplada a peroxidasa.

12. Detección de proteínas mediante *Western-Blot*

Los anticuerpos primarios y secundarios usados para las técnicas de *Western-Blot* se muestran en las **Tablas I y II**.

Los inmunoprecipitados o lisados totales, según el caso, se resolvieron en geles de acrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturizantes (*SDS-PAGEs*) en condiciones reductoras o no reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore), que se bloquearon con 5% de leche en polvo (Molico Sveltesse, Nestlé) en TBS (TrisHCl 10mM pH 8, NaCl 150 mM). En el caso de la detección de proteínas biotiniladas, el bloqueo se llevo a cabo en el tampón TGG 3% BSA (1% leche, 0,5% Tween-20, 10% glicerol, 5% glucosa). La incubación con los anticuerpos específicos se realizó en TBS-0,05% Tween20 (Sigma), excepto en el caso de las proteínas biotiniladas que se llevo a cabo en el tampón de bloqueo TGG 0,3% BSA. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos en TBS-0,05% Tween-20 (0,5% Tween-20 para las membranas

hibridadas con avidina), tras los cuales se procedió a su revelado en el caso de los anticuerpos directamente acoplados a peroxidasa, o a su incubación con anticuerpos secundarios. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios anti-IgGs de ratón acoplados a peroxidasa, o con avidina acoplada a peroxidasa en el caso de las proteínas biotiniladas en las mismas condiciones de incubación antes descritas, seguidos de una reacción de quimioluminiscencia con Lumi-Light PLUS (Roche). La intensidad de la señal obtenida se cuantificó por densitometría usando el programa TINA.

13. Ensayos de unión *in vitro* (Pull-down)

La proteína GST (Glutación-S-Transferasa) y las fusiones GST-pT α se expresaron en bacterias *E.coli* (cepa BLB21(DE3)) en condiciones de inducción con 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, Calbiochem) durante 1 hora a 37°C. Las bacterias se lisaron en PBS suplementado con 1mM PMSF y con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche), 15 mM de 1,4 ditiotreitól (DTT, Roche) y una punta de tip de lisozima (Sigma). Los lisados se sonicaron en un sonicador de tip (Labsonic U, B.Braun). Las proteínas de fusión a GST se purificaron por afinidad usando bolas de Glutación-Sefarosa (Amersham Biosciences), incubándolas durante 2 horas a temperatura ambiente con rotación. Las proteínas unidas a las bolas se lavaron entre 6 y 8 veces en PBS suplementado con inhibidores de proteasas antes de ponerlas en contacto con los lisados celulares.

Las células COS7 transfectadas con las distintas construcciones de CMS y Cin85 se lisaron 24 horas después de la transfección en 1% Tritón X100 (Sigma) en PBS suplementado con la mezcla de inhibidores de proteasas, 1mM PMSF y 50mM NaF. Los lisados de las células COS7 se incubaron con GST o las proteínas de fusión a GST, previamente purificadas con bolas Glutación-Sepharosa, durante 16 horas a 4°C. Para las cotransfecciones de Cin85, CMS y CD2BP3, las células COS7 se cotransfectaron con las cantidades de DNA indicadas y se lisaron de la misma manera que se ha explicado anteriormente. Los precipitados se lavaron 6 veces en PBS suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, y se resolvieron en SDS-PAGEs del 10-12% en condiciones reductoras. Las proteínas precipitadas se revelaron por *Western-Blot* con anticuerpos anti-FLAG y anti-IgGs de ratón acopladas a peroxidasa.

14. Análisis de la expresión de genes a nivel transcripcional (Northern-Blot)

La extracción del RNA total de las distintas poblaciones de timocitos y de las células SupT1 se llevó a cabo con el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras de RNA (10 μ g) se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído y se transfirieron a membranas de nylon

(Zeta-Probe B, BioRad). La hibridación con las sondas y los lavados se llevaron a cabo en presencia del reactivo Rapid-Hyb Buffer (Amersham), siguiendo las condiciones del fabricante. Las sondas utilizadas para la hibridación fueron generadas mediante PCR y marcaje con ^{32}P . Para deshibridar las membranas, se incubaron con SDS 0,1% a 100°C durante 3 minutos. Las sondas para CMS (oligonucleótidos 417-365) y Cin85 (oligonucleótidos 383-384) hibridan con la parte carboxilo terminal de la secuencia codificante del los RNA mensajeros. En el caso de Cin85, la sonda reconoce también el RNA mensajero de la isoforma CD2BP3. La sonda para pT α (oligonucleótidos 252-368) esta diseñada contra la región citoplásmica de la secuencia codificante del RNA mensajero, y la sonda para TCR α (oligonucleótidos 63-334) reconoce la región constante en la secuencia codificante del RNA mensajero. La sonda para β -actina se generó por PCR con los oligonucleótidos 259-260. La secuencia de los oligonucleótidos usados para generar las distintas sondas se detalla en la **Tabla III**.

15. Movilización de calcio por citometría de flujo

Las células JR3.11 transducidas se incubaron con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Indo-1AM (Invitrogen) en medio HBSS 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 y 1% FBS durante 30 minutos a 30°C en la oscuridad. Después, las células se lavaron y se incubaron en el mismo medio (sin Indo-1AM) durante 5 minutos a 37°C. Las muestras se analizaron detectando la emisión a 510 nm (canal FL4) y a 400 nm (canal FL5) en un FACSVantage SE Cell Sorter (BD Biosciences). Los niveles de Ca^{2+} se midieron durante 5 minutos antes de la estimulación para obtener una línea basal, y después las células se activaron con anti-CD3 ϵ (UCHT1). Tras observar la caída en la señal de calcio, se añadió un ionóforo de calcio (Sigma) como control de la viabilidad celular y de los reservorios intracelulares de calcio. Los datos se procesaron para calcular la relación entre la emisión en los canales FL4 y FL5 usando el programa Three Star FlowJo (BD. Biosciences).

16. Ensayos de actividad transcripcional de NFAT

Las células JR3.11 transducidas se electroporaron con 30 μg de un vector reportero que codifica para la proteína luciferasa bajo un promotor mínimo que contiene tres copias en tándem del elemento de respuesta a NFAT-AP1 del promotor de la interleuquina 2 humana, o bajo el promotor mínimo de la conalbúmina que contiene tres copias del sitio consenso de unión de NF- κB , y 2 μg del vector reportero pRL-CMV Renilla, donados por el Dr. JM Redondo (Cano *et al.*, 2005). 24 horas después de la transfección, las células se activaron durante 6 horas con anti-CD3 ϵ (UCHT1) o anti-pT α (K5G3), y se lisaron siguiendo las instrucciones del sistema Dual luciferase assay Kit (Promega). Para cada condición experimental, las actividades de las luciferasas se determinaron por duplicado o triplicado en un luminómetro Sirius (Berthold). La

actividad luciferasa se normalizó por la actividad de la luciferasa Renilla (usada como control de la eficiencia de la transfección), y se expresa como veces de inducción relativas a la actividad basal obtenida en las células no estimuladas. En el caso de la actividad basal de NF- κ B, la actividad luciferasa en relativa a las células transducidas con el vector bicistrónico vacío (JR-GFP).

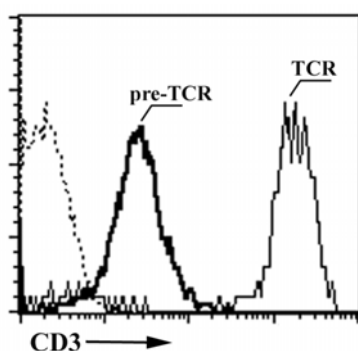
RESULTADOS

RESULTADOS

1. DINÁMICA DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO pre-TCR EN LA MEMBRANA

El complejo pre-TCR se expresa en un periodo muy concreto durante el desarrollo de los linfocitos T, lo que sugiere la existencia de mecanismos específicos de regulación de su expresión. Nuestro grupo ha demostrado que uno de estos mecanismos es la regulación transcripcional de la expresión de la cadena pT α (Ramiro *et al.*, 2001; Ramiro *et al.*, 1996). Sin embargo, han de existir mecanismos de regulación adicionales, ya que, a pesar de la similitud en la composición bioquímica entre los complejos pre-TCR y TCR $\alpha\beta$, los niveles de expresión en membrana de ambos son muy distintos, siendo los niveles del complejo pre-TCR entre 50-100 veces menores que un TCR $\alpha\beta$ maduro en la superficie celular (**Figura 8**).

Figura 8. Niveles de expresión de CD3 en las poblaciones pre-TCR y CD4 simples positivas en timocitos aislados *ex vivo*. Los timocitos totales aislados *ex vivo* fueron



incubados con anti-CD8-FITC, anti-CD3 ϵ -PE y anti-TCR $\alpha\beta$ -TC o con anti-CD8-FITC, anti-CD3 ϵ -PE y anti-CD4-PC5 y se analizaron mediante citometría de flujo de tres colores. La población pre-TCR (trazo grueso) fue seleccionada electrónicamente como CD8+TCR $\alpha\beta$ -, y la población TCR CD4SP (trazo fino) como CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ +. Los niveles de autofluorescencia (trazo punteado) de determinaron con anticuerpos isotípicos inespecíficos.

Los niveles de expresión de un receptor en la membrana son el resultado de un equilibrio entre varios procesos, por un lado, la síntesis, ensamblaje y transporte de los componentes desde el retículo endoplásmico a la membrana, y por otro lado, su internalización, reciclaje y degradación (**Figura 4**) (Alcover y Alarcon, 2000; Carrasco *et al.*, 2003). Además, uno o varios de estos procesos pueden verse alterados por la presencia de estímulos extracelulares, lo que puede modificar los niveles de expresión de un complejo en la membrana. En el caso del TCR, se sabe que en ausencia de estímulo, el complejo de la membrana se internaliza y recicla de forma continua, requiriendo muy poco aporte de proteínas de nueva síntesis. En presencia de un estímulo, el complejo TCR internalizado es desviado intracelularmente hacia los lisosomas para su degradación, provocando un descenso de los niveles en la membrana o modulación negativa (**Figura 5**) (Alcover y Alarcon, 2000; Liu *et al.*, 2000). Sin

embargo, los mecanismos que regulan la expresión en membrana del complejo pre-TCR son desconocidos. Datos previos generados en nuestro laboratorio demostraron que la cadena pT α posee un motivo de retención en el retículo endoplásmico, responsable de la baja exportación del complejo desde su lugar de síntesis hasta la membrana. Sin embargo, aunque la eliminación de dicho motivo se traduce en un aumento de los niveles de expresión en membrana del complejo pre-TCR, no se alcanzan los niveles de expresión de un complejo TCR $\alpha\beta$ (Carrasco *et al.*, 2001). Estos datos sugieren que, además de la retención en el retículo endoplásmico, los niveles de expresión en membrana del complejo pre-TCR están regulados por mecanismos adicionales. Por ello, quisimos estudiar la dinámica de expresión y la estabilidad del complejo pre-TCR en la membrana celular, con el objetivo de encontrar un mecanismo diferencial que diera cuenta de los bajos niveles de expresión del pre-TCR en la membrana.

1.1 Proceso de endocitosis del complejo pre-TCR

Para abordar el estudio de la dinámica de expresión en membrana del complejo pre-TCR en humanos hemos usado como modelo una línea celular pre-T humana, SupT1, que expresa de forma natural niveles bajos de CD3 y pT α en membrana, similares a los que se observan en células pre-T *in vivo* (**Figura 9A**).

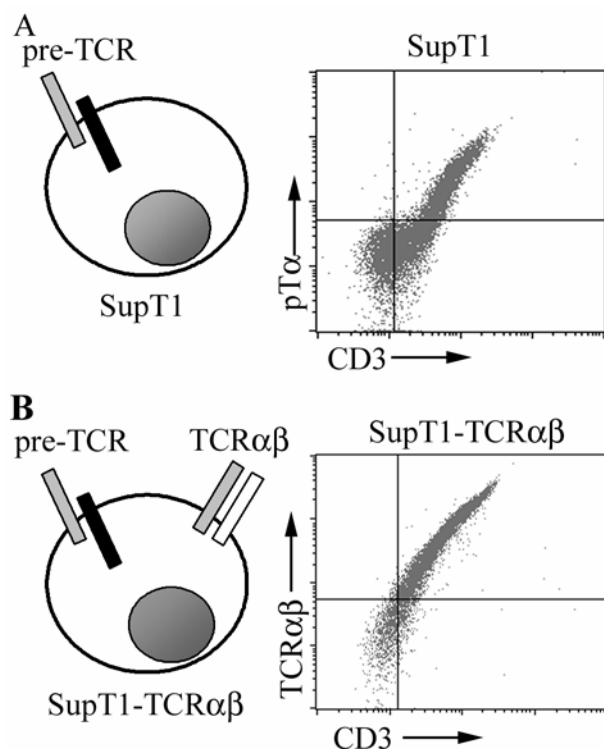


Figura 9. Niveles de expresión en membrana de los complejos pre-TCR y TCR en células transfectadas SupT1. **A)** Representación esquemática y análisis por citometría de flujo del complejo pre-TCR endógeno en las células SupT1. Las células SupT1 se marcaron con anti-pT α (K5G3), anti-IgGs de ratón biotiniladas y avidina-APC, más anti-CD3 ϵ -PE. **B)** Esquema y análisis por citometría de flujo de la expresión del complejo TCR en los tranfectantes estables SupT1-TCR $\alpha\beta$. Las células se incubaron con anti-TCR $\alpha\beta$ revelado con anti-IgGs de ratón conjugadas con APC y con anti-CD3 ϵ -PE. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo de dos colores.

Para analizar los procesos de internalización, reciclaje y degradación del complejo pre-TCR estudiamos de forma comparativa cambios en los niveles de expresión del complejo tras el tratamiento con dos tipos de drogas, cicloheximida y brefeldina-A. La cicloheximida es un antibiótico antifúngico que bloquea los procesos de síntesis *de novo* en el retículo endoplásmico, permitiendo el análisis de la estabilidad del complejo en la membrana, es decir, la necesidad del aporte de proteínas de nueva síntesis para el mantenimiento de los niveles de expresión en membrana (**Figura 10**). Por otro lado, la brefeldina A es un metabolito fúngico que promueve la fusión de compartimentos intracelulares, formándose compartimentos mixtos retículo-Golgi, endosomas tempranos-transGolgi y lisosomas-endosomas tardíos, de manera que se bloquea el transporte a la membrana de proteínas de nueva síntesis (efecto compartido con la cicloheximida), el reciclaje de los complejos internalizados desde la membrana y el transporte desde los endosomas hasta los lisosomas (**Figura 10**).

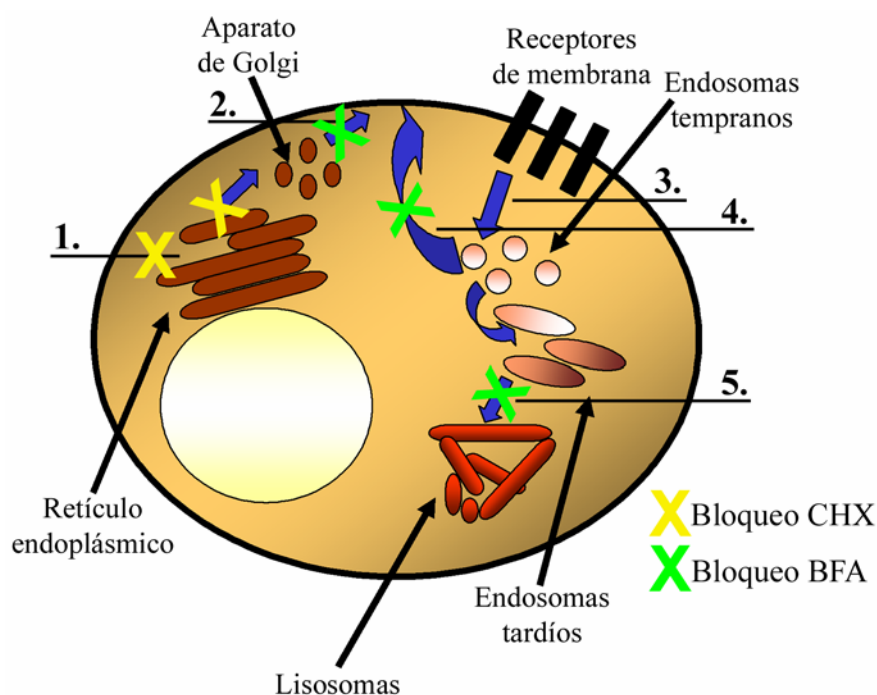


Figura 10. Representación esquemática de los mecanismos de transporte intracelular implicados en la expresión de receptores en membrana y los bloqueos provocados por la cicloheximida (CHX) y la brefeldina A (BFA).

1. Síntesis de proteínas. 2. Transporte a la membrana. 3. Internalización. 4. Reciclaje. 5. Paso a lisosomas y degradación.

El efecto de la cicloheximida y la brefeldina A sobre la expresión en membrana de un TCR $\alpha\beta$ maduro había sido previamente descrito (Liu *et al.*, 2000), por lo que se hicieron transfectantes estables de la cadena TCR α en la línea SupT1 (SupT1-TCR $\alpha\beta$) que se utilizaron como control de la expresión de un TCR $\alpha\beta$ convencional. Este

complejo, reconocido por anticuerpos anti-TCR $\alpha\beta$, se expresa a niveles altos en la membrana, equivalentes a los expresados en una célula T madura (**Figura 9B**). De esta manera podemos analizar el comportamiento de los complejos TCR y pre-TCR sobre el mismo fondo celular.

Las líneas SupT1 y SupT1-TCR $\alpha\beta$ fueron tratadas con brefeldina A o cicloheximida, y a los tiempos indicados en la **Figura 11** se analizaron los niveles de expresión de los complejos pre-TCR o TCR $\alpha\beta$ por citometría de flujo con anticuerpos anti-CD3 ϵ o anti-TCR $\alpha\beta$, respectivamente. Como se había descrito previamente en células T maduras, el complejo TCR $\alpha\beta$ se pierde de la membrana en presencia de brefeldina A, lo que indica que el complejo se internaliza de forma continua (Liu *et al.*, 2000). El complejo pre-TCR también desaparece de la membrana con una cinética aún más rápida que el complejo TCR, puesto que tras dos horas de tratamiento con brefeldina A, se ha perdido más del 70% de los niveles de pre-TCR, mientras que la pérdida del TCR es aproximadamente del 40% (**Figura 11A**). Sin embargo, el tratamiento con cicloheximida muestra un comportamiento totalmente distinto entre los complejos TCR y pre-TCR. Mientras que los niveles de expresión del complejo TCR son relativamente estables puesto que se pierde un máximo del 20% de los receptores tras 8h de tratamiento, lo que indica la independencia de este complejo de la síntesis *de novo* (Liu *et al.*, 2000), el complejo pre-TCR desaparece de la membrana (**Figura 11B**).

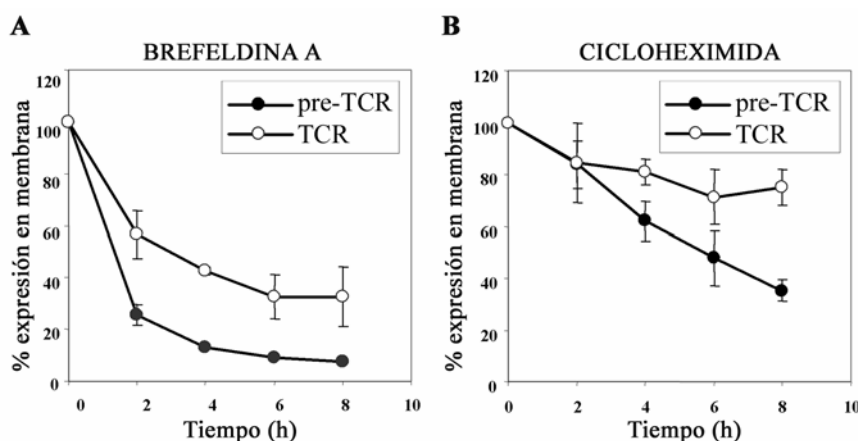


Figura 11. Cinéticas de expresión en la membrana de los complejos pre-TCR y TCR tras el tratamiento con A) brefeldina A o B) cicloheximida. A los tiempos de tratamiento indicados, las células se incubaron con anti-CD3 ϵ -APC en el caso de las SupT1, y anti-TCR $\alpha\beta$ seguido de anti-IgGs de ratón conjugadas con PE para los transfectantes estables SupT1-TCR $\alpha\beta$. Los porcentajes de expresión en membrana, cuantificada por citometría de flujo, son relativos a células sin tratar, y se determinaron según se indica en Materiales y Métodos. Los datos representan la media entre tres experimentos \pm SD.

Estos datos indican que tanto el pre-TCR como el TCR se internalizan de forma continua, con una tasa mayor de internalización en el caso del pre-TCR. Sin embargo, una vez dentro de la célula, el TCR internalizado vuelve de nuevo a la membrana (reciclaje), manteniéndose niveles de expresión constantes en la superficie en ausencia de síntesis *de novo*, mientras que el complejo pre-TCR desaparece en la membrana, indicando una baja tasa de reciclaje y una fuerte dependencia del aporte de los complejos de nueva síntesis para mantener los niveles en membrana.

1.2 Degradación constitutiva del complejo pre-TCR

Los datos obtenidos a partir de la cinética de expresión del pre-TCR en presencia de cicloheximida sugerían que el complejo, una vez internalizado, no era capaz de volver a la membrana como el complejo TCR. Para analizar el destino intracelular de los complejos pre-TCR una vez internalizados, decidimos seguir el comportamiento del único componente del complejo que no se retiene en el retículo endoplásmico, la cadena TCR ζ . Para ello, generamos transfectantes estables en la línea SupT1 con una construcción quimérica de la cadena TCR ζ fusionada a la proteína verde fluorescente (TCR ζ -GFP). En primer lugar, analizamos la distribución intracelular de la proteína quimérica mediante microscopía de fluorescencia. Esta construcción muestra un patrón mayoritariamente intracelular, acumulado en vesículas, además de un halo de baja intensidad en torno a la célula. Para determinar en qué orgánulos celulares estaba presente la proteína quimérica, analizamos la colocalización de TCR ζ -GFP con distintos marcadores celulares mediante microscopía confocal (**Figura 12**). Gracias a esta técnica, determinamos que el halo que rodea a la célula corresponde a la membrana plasmática, mediante la colocalización con la molécula de membrana CD4 (**Figura 12**, primer panel). Comprobamos la ausencia de la proteína quimérica TCR ζ -GFP en el retículo endoplásmico mediante la falta de colocalización con un anticuerpo anti-Calnexina (**Figura 12**, segundo panel). Respecto a los acúmulos intracelulares de TCR ζ -GFP, detectamos una colocalización parcial con un marcador del aparato de Golgi, Manosidasa II, donde la cadena TCR ζ se acumula antes de ser transportada a la membrana junto con el resto de las cadenas (**Figura 12**, tercer panel), y también observamos una alta colocalización con el marcador de endosomas tardíos y lisosomas CD63 (**Figura 12**, cuarto panel). Al cuantificar esta colocalización determinamos que el $55 \pm 17\%$ (n=50) de la proteína quimérica TCR ζ -GFP está presente en los lisosomas. Esta elevada colocalización de TCR ζ -GFP con los lisosomas llama la atención puesto que en el caso del complejo TCR $\alpha\beta$ en células T maduras, una construcción similar muestra una localización mayoritaria en endosomas de reciclaje (Blanchard *et al.*, 2002).

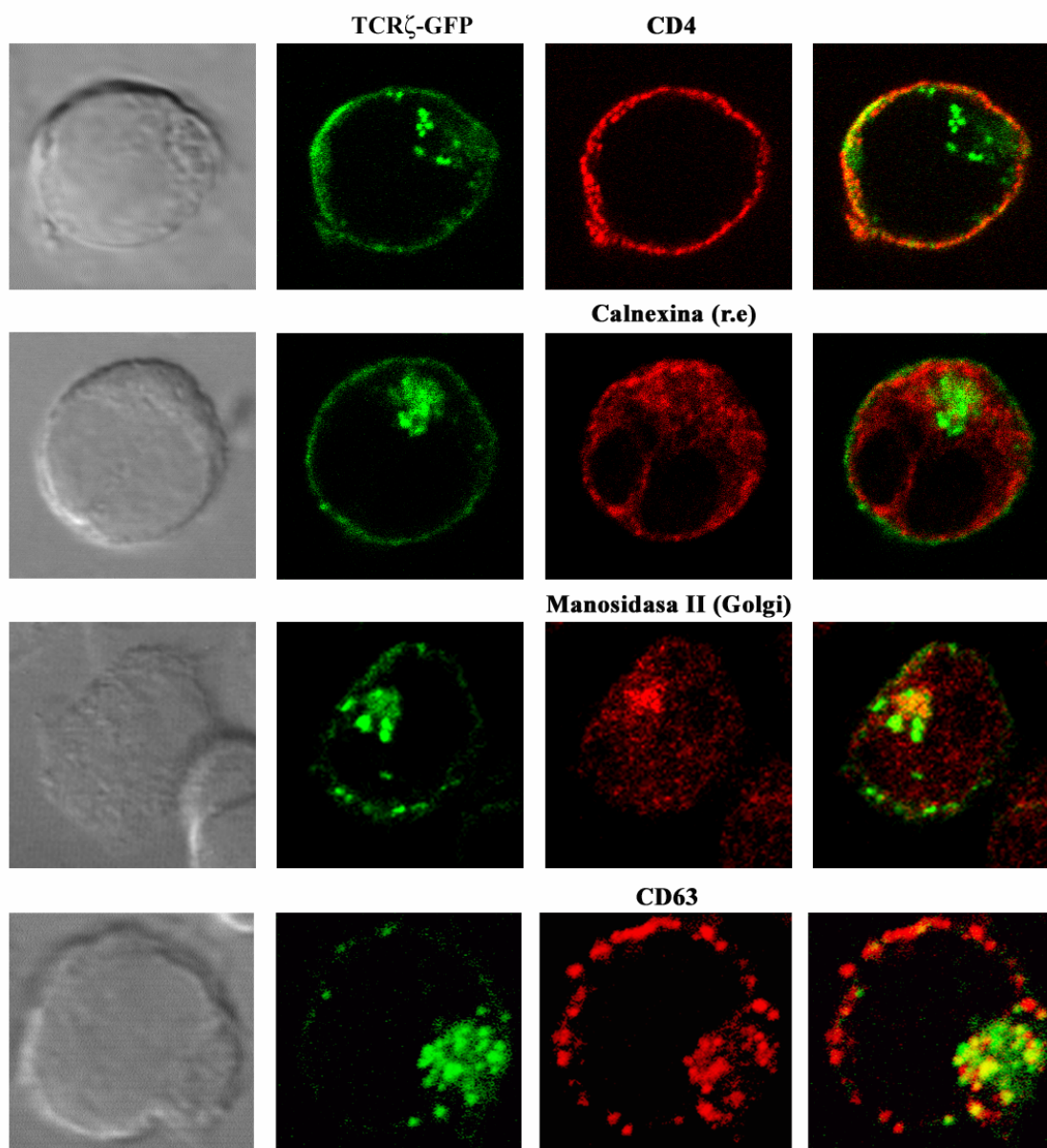


Figura 12. **Distribución intracelular de la construcción quimérica TCR ζ -GFP en la línea SupT1.** Los transfectantes estables SupT1-TCR ζ -GFP se marcaron con anticuerpos anti-CD4 (marcador de membrana, primer panel), anti-Calnexina (marcador de retículo endoplásmico, segundo panel), anti-Manosidasa II (marcador del aparato de Golgi, tercer panel) y anti-CD63 (marcador de endosomas tardíos-lisosomas, cuarto panel) y se revelaron con anti-IgGs de ratón o conejo, según el origen del anticuerpo primario, acoplados a Alexa-594.

Seguidamente, analizamos los niveles de expresión del complejo pre-TCR por citometría de flujo en presencia de brefeldina A y cicloheximida en estos clones estables, analizando de forma simultánea los niveles de CD3 en membrana y los niveles totales de GFP, que nos daban cuenta de la estabilidad de la quimera TCR ζ -GFP. En presencia de cicloheximida, paralelamente a la pérdida de los niveles en membrana de CD3, también desaparece la quimera TCR ζ -GFP (**Figura 13, A y B**), lo que indica que

la quimera TCR ζ -GFP se degrada rápidamente. Tras el tratamiento con brefeldina A, la expresión de CD3 en la superficie disminuye, pero la expresión intracelular de la quimera TCR ζ -GFP aumenta progresivamente. Nuestra interpretación es que la degradación de TCR ζ -GFP está alterada por la brefeldina A al estar bloqueado su transporte hasta los lisosomas (**Figura 10**), acumulándose en un compartimento mixto retículo-Golgi inducido por la brefeldina A. Ante el tratamiento simultáneo con ambas drogas TCR ζ -GFP por un lado no se acumula (síntesis bloqueada) y por otro lado se retrasa su degradación (bloqueo del transporte a los lisosomas) (**Figura 13, A y B**).

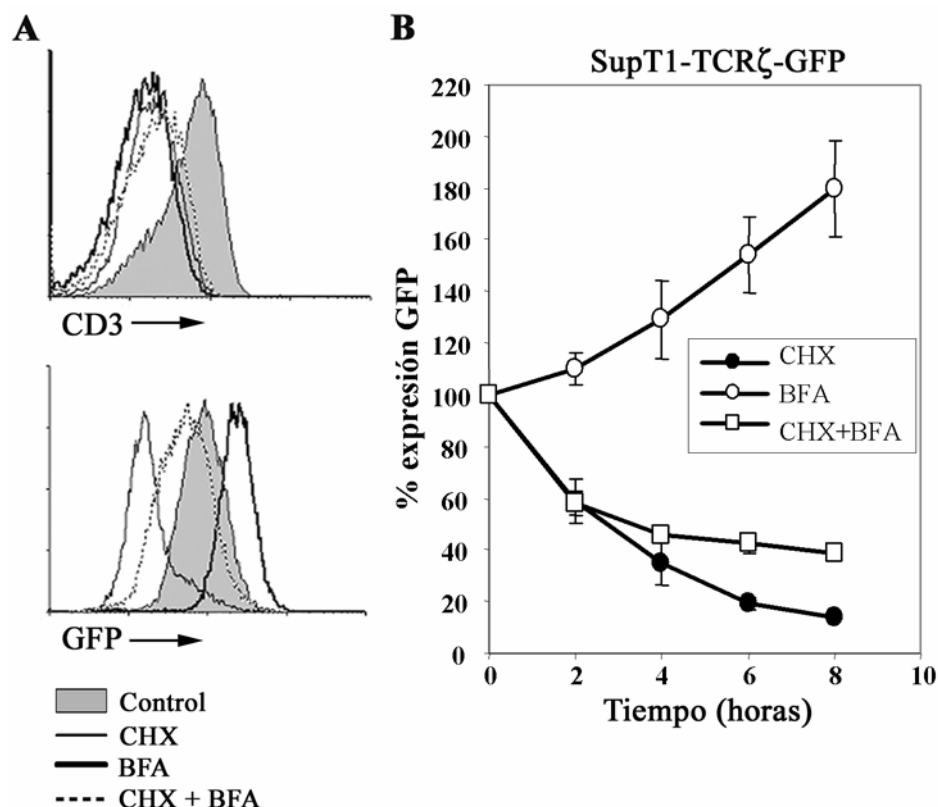


Figura 13. Efecto de las drogas cicloheximida y brefeldina A en los transfectantes estables SupT1-TCR ζ -GFP. Las células SupT1-TCR ζ -GFP se incubaron con cicloheximida y brefeldina A, o la combinación de ambas drogas. A los tiempos indicados se analizó simultáneamente la expresión de pre-TCR en membrana con anticuerpos anti-CD3 ϵ -PE, y la expresión de GFP mediante citometría de flujo de dos colores. **A)** Niveles de expresión de CD3 ϵ y GFP correspondientes a 8h de tratamiento. **B)** Cinética correspondiente a los niveles de GFP con los distintos tratamientos, referidos a las células sin tratar. Los datos representan la media de tres experimentos \pm SD.

En conclusión, tanto la localización intracelular de la quimera TCR ζ -GFP en los lisosomas como su desaparición en presencia de cicloheximida indican claramente que el destino intracelular de los complejos pre-TCR internalizados es su degradación de

forma constitutiva, no observándose para el pre-TCR la capacidad de reciclaje vista para el TCR. Para descartar algún posible efecto inespecífico de la presencia de la proteína GFP fusionada a cadena TCR ζ que pudiese alterar la localización subcelular de la proteína en estudio, decidimos analizar el comportamiento de las cadenas TCR ζ y TCR β endógenas por citometría de flujo mediante tinción intracelular en presencia de cicloheximida. Los datos obtenidos muestran claramente que tanto TCR β como TCR ζ desaparecen en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas, lo que indica que también las proteínas endógenas se están degradando de forma constitutiva (**Figura 14, A y B**).

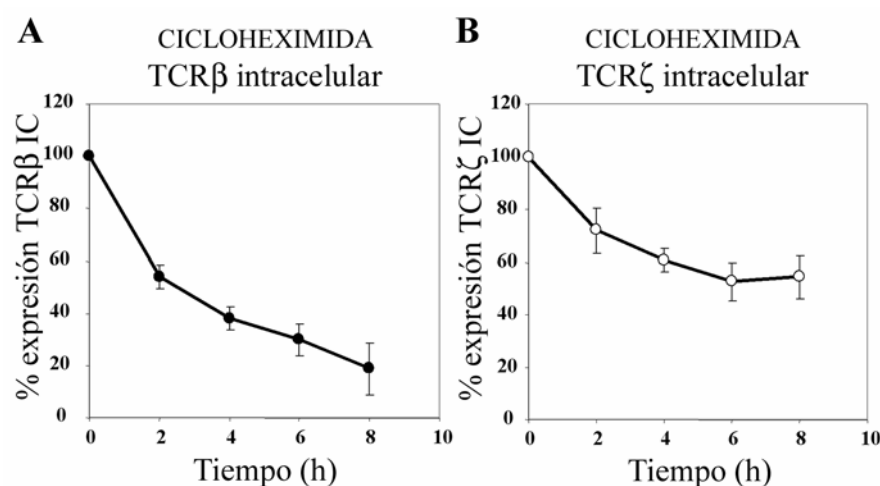


Figura 14. Efecto de la cicloheximida sobre los distintos componentes del pre-TCR. Las células SupT1 fueron tratadas con cicloheximida y a los tiempos indicados se marcaron intracelularmente para detectar **A)** TCR β con anti-TCR β (β F1) revelado con anti-IgG1-PE o **B)** TCR ζ con anti-TCR ζ (448) revelado con anti-IgGs de conejo acopladas a PE. Los datos representan la media de tres experimentos \pm SD.

Los resultados obtenidos, tanto por citometría de flujo como mediante microscopía confocal, muestran que al menos dos de las cadenas del complejo, TCR ζ y TCR β , se degradan de forma constitutiva. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de la cantidad total de estas proteínas presentes en la célula estaría formando parte del complejo pre-TCR que se expresa en la membrana, de manera que la degradación que vemos para la totalidad de estas moléculas podría no estar reflejando el comportamiento del complejo completo que se expresa en la membrana. Datos previos generados en el laboratorio demostraron que, en efecto, las cadenas TCR ζ específicamente asociadas al complejo pre-TCR se degradan de forma constitutiva en presencia de cicloheximida, y que esta degradación es dependiente del proteasoma y de los lisosomas (Carrasco *et al.*, 2003). Además, estudios mediante aproximaciones bioquímicas con células marcadas con biotina demostraron que los heterodímeros pT α /TCR β que se expresan en la

membrana también se degradan de forma constitutiva (Carrasco *et al.*, 2003). Por tanto, decidimos analizar la contribución de los lisosomas y del proteasoma en la degradación del heterodímero pT α /TCR β que se expresa en la membrana, para lo cual se marcaron las proteínas de membrana con biotina. Tras el marcaje con biotina, las células se pusieron de nuevo en cultivo en presencia o ausencia de inhibidores de la degradación lisosomal (cloroquina) o del proteasoma (lactacistina y epoxomicina). El marcaje con biotina se analizó mediante *Western-Blot* con avidina-peroxidasa como se explica en el apartado de Materiales y Métodos (**Figura 15**). Estos datos muestran que la marca de biotina del heterodímero pT α /TCR β desaparece (**Figura 15A**, carriles 1 y 2, y (Carrasco *et al.*, 2003)), lo que demuestra que el complejo presente en la membrana se degrada de forma continua en ausencia de estímulo. La incubación de las células con inhibidores de la actividad de los lisosomas o del proteasoma mostró descenso en la tasa de degradación del dímero pT α /TCR β (**Figura 15A**, carriles 3, 4 y 5 frente a carril 2, y **15B**). Estos resultados sugieren, por tanto, que el complejo pre-TCR que se expresa en la membrana se degrada de forma continua en ausencia de estímulo, y que en esta degradación participan tanto el sistema ubiquitina-proteasoma como los lisosomas.

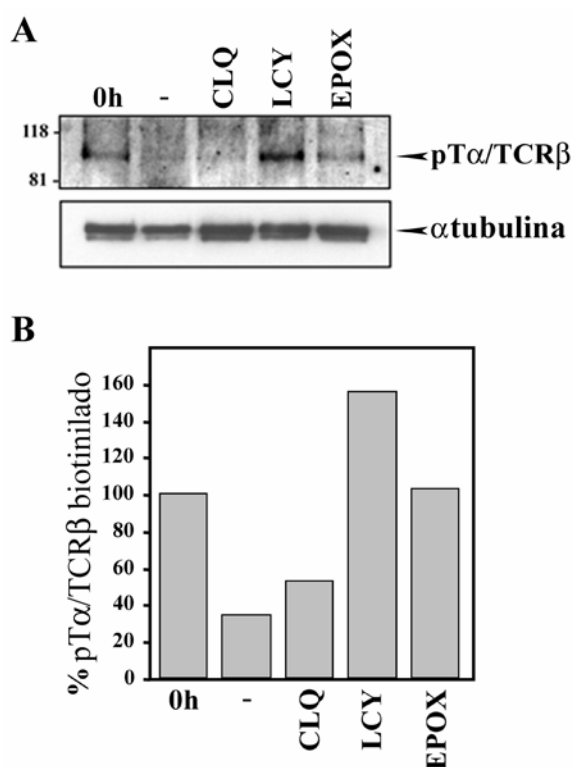


Figura 15. Degradación constitutiva de los dímeros pT α /TCR β . **A)** Las células SupT1 se marcaron con biotina, y las células se pusieron en cultivo durante 6 horas en presencia o ausencia de inhibidores de la degradación lisosomal (cloroquina, CLQ) o del proteasoma (lactacistina, LCY, y epoxomicina, EPOX). Tras los tratamientos, las células se lisaron, se inmunoprecipitaron con anti-CD3 ϵ y los precipitados se resolvieron en *SDS-PAGEs* en condiciones no reductoras. La marca de biotina se detectó mediante *Western-Blot* con avidina-peroxidasa. Se realizaron hibridaciones con anti- α -tubulina y anti-IgGs de ratón acopladas a peroxidasa como control de carga. **B)** Análisis densitométrico de la cantidad de dímero biotinilado, relativo a la cantidad de α -tubulina en cada carril.

1.3 El dominio citoplásmico de la cadena pTα es responsable de la degradación constitutiva del complejo pre-TCR

Las cinéticas comparativas de la expresión de los complejos pre-TCR y TCR en presencia de cicloheximida muestran un comportamiento claramente distinto entre ambos complejos, de manera que el complejo pre-TCR se internaliza y degrada de forma continua en ausencia de estímulo, mientras que el complejo TCR se mantiene estable (**Figura 11B**). Puesto que la única diferencia en la composición bioquímica entre ambos complejos es la presencia de la cadena invariante pTα en lugar de TCRα, es lógico pensar que la responsabilidad de la degradación constitutiva del complejo pre-TCR recae en la cadena pTα. Al comparar la estructura de las cadenas pTα y TCRα, además de la ausencia de un segundo dominio extracelular de inmunoglobulinas en pTα, destaca la longitud del tallo intracelular de pTα, de 114 aminoácidos respecto a los 6 aminoácidos intracelulares de TCRα. Quisimos analizar si el tallo intracelular de pTα tenía algún papel en el proceso de degradación del pre-TCR. Para ello, realizamos una construcción quimérica que codifica para el dominio extracelular de TCRα seguido del dominio transmembrana e intracelular de pTα (TCRα-pTα, esquema en **Figura 16A**). Esta construcción se transfectó en la línea SupT1 para obtener clones estables que expresaran un receptor quimérico TCRα-pTα/TCRβ en la membrana (SupT1 TCRα-pTα, **Figura 16A**).

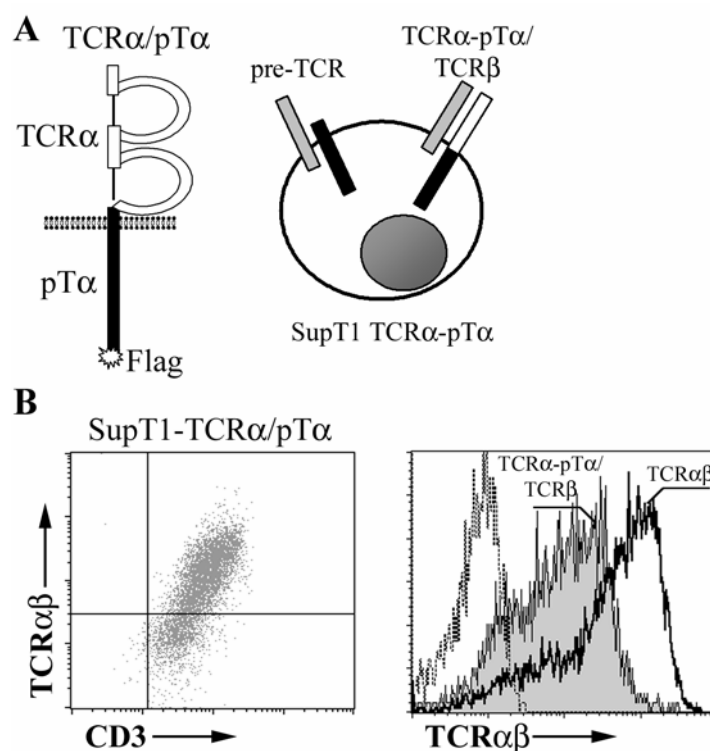


Figura 16. **Transfectantes estables SupT1-TCR α /pT α .** **A)** Esquema de la construcción quimérica TCR α /pT α introducida en las células SupT1, y de los receptores expresados en los transfectantes SupT1-TCR α /pT α . **B)** Expresión en superficie del pre-TCR endógeno y el receptor quimérico TCR α -pT α /TCR β . Los transfectantes estables se marcaron con anti-TCR $\alpha\beta$ revelado con anti-IgGs de ratón acopladas a APC y con CD3 ϵ -PE (histograma biparamétrico). Las células se analizaron mediante citometría de flujo de dos colores. En el histograma monoparamétrico, se comparan los niveles de expresión de TCR $\alpha\beta$ en los transfectantes SupT1-TCR $\alpha\beta$ y SupT1-TCR α /pT α , revelados con anti-TCR $\alpha\beta$ y anti-IgGs de ratón-APC.

Para confirmar la expresión de la construcción en la membrana se realizaron análisis mediante citometría de flujo con anticuerpos anti-TCR $\alpha\beta$. Este estudio mostró un primer dato: los niveles de expresión del complejo quimérico TCR α -pT α /TCR β se hallan drásticamente reducidos en comparación con los niveles de expresión de un TCR $\alpha\beta$ convencional en estas células, (**Figura 16B**, histogramas monoparamétricos, y comparar **Figuras 16B y 9B**). Este descenso en los niveles de expresión podría deberse en parte a la capacidad de retención en el retículo que presenta el tallo intracelular de pT α (Carrasco *et al.*, 2001), aunque existía la posibilidad de que el tallo estuviera modificando el comportamiento en la superficie del complejo quimérico.

Para analizar la posible implicación del tallo intracelular de pT α en la internalización y degradación del complejo que se expresa en la membrana, analizamos las cinéticas de expresión en membrana en presencia de cicloheximida y brefeldina A en los transfectantes quiméricos. En presencia de brefeldina A, el complejo quimérico TCR α -pT α /TCR β se internaliza de forma continua, habiendo aumentado su velocidad de internalización con respecto al TCR (comparar **Figura 17A** con **Figura 11A**). Además, la cinética en presencia de cicloheximida muestra claramente que el dominio intracitoplásmico de pT α es suficiente para inducir la degradación constitutiva del complejo TCR $\alpha\beta$ (comparar **Figura 17B y 11B**). En la construcción quimérica TCR α -pT α se incluyó un epítipo Flag tras la secuencia codificante para pT α (**Figura 16A**), lo que nos permitía también seguir el comportamiento intracelular de la quimera mediante *Western-Blot*. El tratamiento con cicloheximida y posterior inmunoprecipitación de las quimeras muestra que tanto el monómero como el dímero formado por la quimera TCR α /pT α y TCR β se degradan en ausencia de estímulo (**Figura 17C**).

Para confirmar que los complejos que específicamente se expresan en la membrana son degradados, se recurrió al marcaje con biotina de los complejos quiméricos en las células SupT1 TCR α /pT α , y tras incubación a distintos tiempos a 37°C, las células se lisaron e inmunoprecipitaron con anti-CD3 ϵ . Su análisis mediante *Western-Blot* con avidina acoplada a peroxidasa demostró que la presencia del dominio citoplasmático de pT α es suficiente para inducir la degradación constitutiva del

complejo quimérico (datos no mostrados (Carrasco *et al.*, 2003)). El conjunto de estos datos indica que la internalización y degradación del complejo pre-TCR es una propiedad exclusiva de este complejo, no compartida por el TCR, que depende del dominio intracitoplásmico de la cadena pT α .

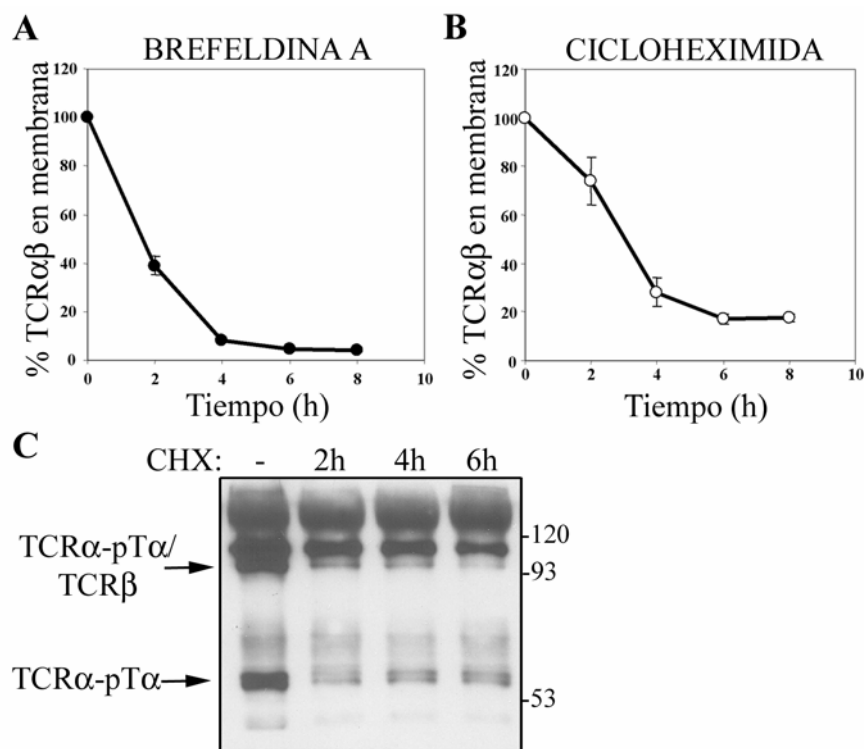


Figura 17. Efecto de la brefeldina A y cicloheximida sobre los transfectantes SupT1-TCR α /pT α . Los transfectantes se trataron con **A)** brefeldina A o **B)** cicloheximida, y a los tiempos indicados se analizaron los niveles de expresión del complejo quimérico TCR α -pT α /TCR β por citometría de flujo con anti-TCR $\alpha\beta$ revelado con anti-IgGs de ratón acopladas a APC. Los datos representan la media de tres experimentos \pm SD. **C)** Las células se incubaron en presencia de cicloheximida y a los tiempos indicados, las células se lisaron y se inmunoprecipitaron con anti-pT α (CT). Los precipitados se resolvieron en SDS-PAGEs en condiciones no reductoras y se analizaron por Western-Blot con anti-FLAG revelado con anti-IgGs de ratón acopladas a peroxidasa. Se muestra un experimento representativo de cuatro.

1.4 Cinética de internalización y transporte intracelular del complejo pre-TCR

Los abordajes seguidos hasta ahora para determinar los mecanismos que controlan el proceso de internalización y degradación del complejo pre-TCR no permitían un análisis en detalle del complejo que se expresa en la membrana. Debido a su bajo nivel de expresión en la membrana, las técnicas bioquímicas usando marcajes con biotina no son suficientemente resolutivas para seguir los distintos pasos del camino

intracelular del pre-TCR. Decidimos emplear una nueva técnica para marcar de manera más eficiente el complejo que se expresa en la membrana: usar anticuerpos que marquen el complejo de la membrana y seguir su transporte intracelular mediante microscopía confocal. Esta técnica, además de permitir la observación del complejo, nos permitiría detectar su presencia en distintos orgánulos intracelulares, así como analizar los mecanismos moleculares implicados en dicho transporte. Aproximaciones similares se han usado para determinar el destino intracelular del complejo TCR en condiciones de reposo y estimulación (Liu *et al.*, 2000; Niedergang *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2003; Valitutti *et al.*, 1997).

El complejo pre-TCR está formado por 6 cadenas distintas: pT α , TCR β , CD3 ϵ , γ , δ y TCR ζ . En principio, podríamos usar cualquiera de ellas para seguir el complejo. En general, los anticuerpos usados para detectar el complejo pre-TCR reconocen la cadena CD3 ϵ . Sin embargo, uno de los efectos más claros que producen los anticuerpos anti-CD3 ϵ , ampliamente descrito para el caso del TCR (Alcover y Alarcon, 2000), es un descenso o modulación negativa de los niveles en membrana, debido a la activación del receptor y su desvío intracelular de su ruta normal de reciclaje hacia una ruta degradativa (**Figura 5**) (Liu *et al.*, 2000). Por tanto, los anticuerpos anti-CD3 ϵ provocan una alteración en los procesos de transporte del TCR. Puesto que nuestro interés principal se centra en el transporte desde la membrana en ausencia de estímulo de la cadena pT α , decidimos usar un anticuerpo contra el dominio extracelular de pT α , generado en nuestro laboratorio (K5G3, **Figura 9** y (Ramiro *et al.*, 2001)). Este anticuerpo presenta una ventaja adicional frente a los anticuerpos anti-CD3 ϵ : el tratamiento de las células con anti-pT α no altera los niveles de expresión en membrana de manera significativa (**Figura 18**), ni presumiblemente, su transporte intracelular, lo que nos permitiría estudiar el proceso de degradación constitutiva del complejo pre-TCR.

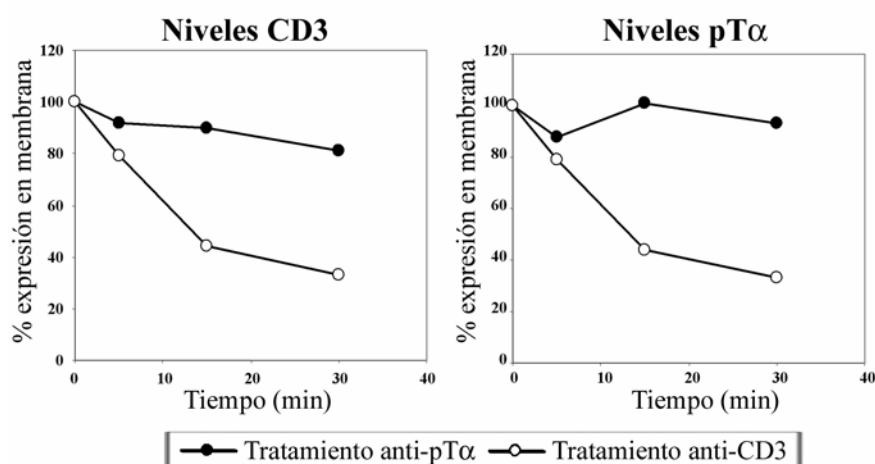


Figura 18. **Efecto de los tratamientos con anticuerpos anti-pT α o anti CD3 sobre los niveles de expresión del complejo pre-TCR en las células SupT1.** Las células SupT1 se incubaron con anti-CD3 ϵ (UCHT1) o con anti-pT α (K5G3) durante 30 minutos a 37°C. A los distintos tiempos, los niveles de expresión en membrana de CD3 ϵ y pT α se determinaron por citometría de flujo mediante tinciones con anti-CD3 ϵ (UCHT1) revelado con anti-IgG1-FITC y anti-pT α (K5G3) revelado con anti-IgG2a-FITC, respectivamente. Se muestra un experimento representativo de tres.

1.4.1. Internalización de la cadena pT α en la línea celular SupT1

Para estudiar el proceso de endocitosis del complejo pre-TCR, las células SupT1 se marcaron con el anticuerpo anti-pT α durante 15 minutos a 37°C, se lavó el exceso de anticuerpo y se dejaron 15 minutos adicionales a 37°C, como se representa en la **Figura 19**.

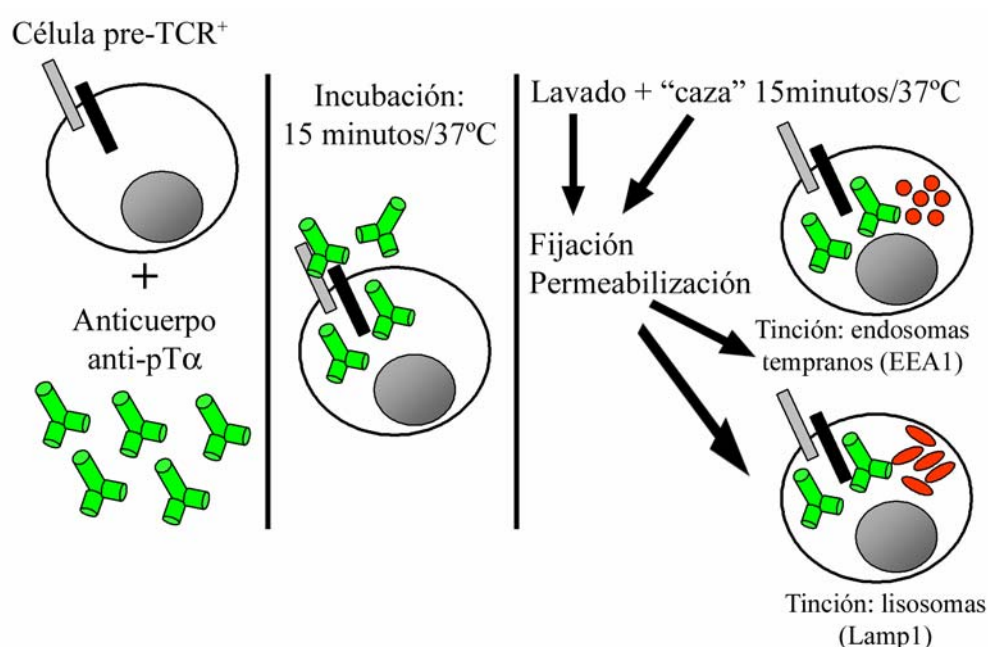


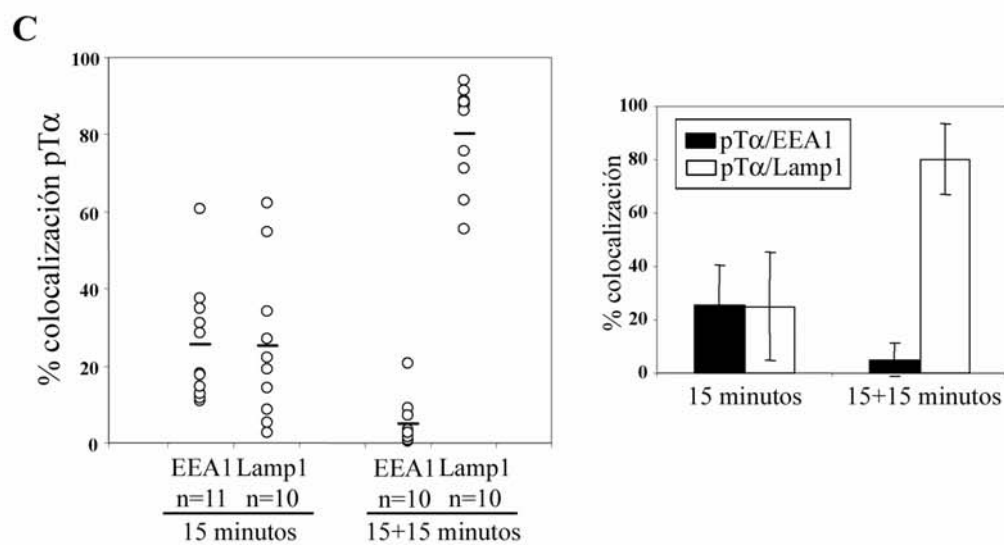
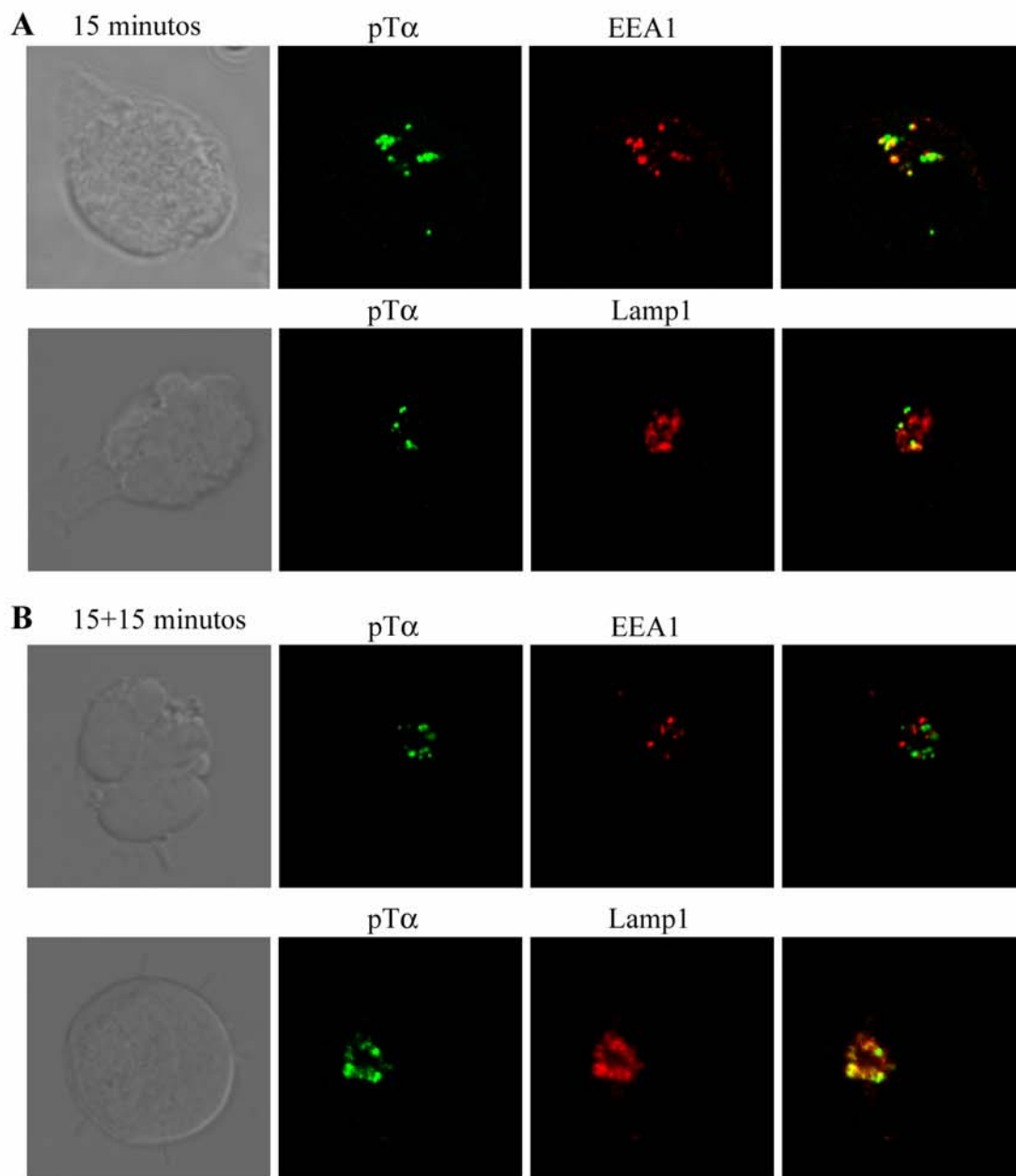
Figura 19. **Esquema del marcaje del pre-TCR con anti-pT α para su análisis mediante microscopía confocal.** Las células se incubaron con el anticuerpo anti-pT α durante 15 minutos a 37°C, se lavó el exceso de anticuerpo y se dejaron durante 15 minutos adicionales a 37°C. Después, las células se fijaron, permeabilizaron y se procedió a su tinción intracelular con anticuerpos anti-EEA1 o anti-Lamp1 como se describe en Materiales y Métodos.

La segunda incubación o "caza" nos permite ver el progreso del complejo pre-TCR marcado durante los primeros 15 minutos a través de los distintos orgánulos intracelulares. Tras su marcaje, las células se fijaron, permeabilizaron y fueron teñidas con anticuerpos específicos de los endosomas tempranos (anti-EEA1) y contra los lisosomas (Lamp1), para detectar la presencia de la cadena pT α en estos orgánulos.

intracelulares analizando la colocalización de ambos marcadores mediante microscopía confocal (**Figura 19**). Los datos obtenidos siguiendo este tipo de abordaje en las células SupT1 se exponen en la **Figura 20**.

En la **Figura 20A** se observa que tras los primeros 15 minutos de incubación con anti-pT α , detectamos el pre-TCR tanto en el compartimento de endosomas tempranos como en los lisosomas. Tras los 15 minutos adicionales de incubación (**Figura 20B**), apenas se observa colocalización del marcaje para pT α con los endosomas tempranos, indicando que pT α ha abandonado este orgánulo y pasa a colocalizar mayoritariamente con los lisosomas. En cazas más largas de 30 minutos, el marcaje para pT α es prácticamente indetectable por microscopía confocal (datos no mostrados), lo que indica que los receptores marcados desde la membrana se degradan por completo en los lisosomas en un tiempo máximo de 30-45 minutos. Los datos expuestos en la **Figura 20A** y **20B**, representados en forma de porcentajes de colocalización con uno u otro orgánulo en la **Figura 20C**, indican que tan sólo en 15 minutos, aproximadamente el 25% de los receptores que estaban en la membrana han llegado a los lisosomas, y que en 30 minutos de incubación total, prácticamente todo el complejo que se había marcado en la membrana durante los primeros 15 minutos ha llegado a los lisosomas y se está degradando. Por tanto, podemos concluir que la velocidad de degradación del complejo pre-TCR es mucho más rápida de lo que podríamos suponer considerando los datos obtenidos mediante los abordajes previos basados en la citometría de flujo y en técnicas bioquímicas.

Figura 20. Endocitosis de la cadena pT α en la línea celular SupT1. Las células SupT1 se marcaron como se describe en la Figura 19 durante **(A)** 15 minutos y **(B)** 15+15 minutos. El marcaje de endosomas tempranos (anti-EEA1) y lisosomas (anti-Lamp1) se reveló con anti-IgG1-TxR. La marca de pT α se reveló con anti-IgG2a-FITC y anti-FITC-Alexa488. Las imágenes mostradas en **(A)** y **(B)** corresponden a una única sección de 1 μ m de grosor. **C)** Cuantificación de la colocalización entre pT α y los marcadores EEA1 y Lamp1. El porcentaje de colocalización se obtuvo según se explica en Materiales y Métodos. El segundo gráfico representa la media de colocalización de todas las células analizadas (n), \pm SD. Las imágenes y cuantificaciones son representativas de tres experimentos independientes.



1.4.2. Internalización de la cadena pT α en timocitos pre-TCR⁺ aislados *ex vivo*

Las líneas celulares son una herramienta muy útil en cualquier tipo de abordaje experimental. Sin embargo, estas líneas se immortalizan en cultivo por mecanismos a menudo desconocidos, por lo que pueden existir diferencias en los procesos analizados en líneas celulares y en condiciones fisiológicas. Por ello, decidimos analizar el proceso de internalización y degradación constitutiva *in vivo*, utilizando para ello timocitos humanos que expresan el complejo pre-TCR durante el desarrollo intratímico de los linfocitos T humanos. Para ello, estas células se aislaron mediante métodos de selección negativa, sin señalar en ningún momento a través del receptor que se expresa en la membrana. Se siguió el mismo tipo de abordaje usado en el apartado anterior para las SupT1 (**Figura 19**): marcaje de 15 minutos a 37°C, lavado e incubación de 15 minutos adicionales a 37°C. Estos experimentos mostraron una primera diferencia con respecto a las SupT1: tras la segunda incubación o caza, el marcaje para pT α es prácticamente indetectable (datos no mostrados), indicando que el transporte de pT α desde la membrana a los lisosomas es más rápido en timocitos aislados *ex vivo* que en las células SupT1. El análisis se hizo sobre células incubadas durante 15 o 30 minutos con el anticuerpo anti-pT α (**Figura 21, A y B**, respectivamente). Estos datos muestran que más de la mitad (60%) de la cadena pT α que estaba en la membrana ha llegado a los lisosomas a los 15 minutos, y este porcentaje de colocalización se mantiene a los 30 minutos de incubación (**Figura 21C**). Puesto que las células se están marcando de forma continua, los datos indican que en los primeros 15 minutos se llega a un estado de equilibrio en el que el pre-TCR estaría presente en toda la ruta endocítica: se marcaría con el anticuerpo anti-pT α en la membrana, se internalizaría y se degradaría de forma continua. En estas células se comprobó que el anticuerpo anti-pT α no inducía ninguna variación en los niveles de pre-TCR en la membrana (**Figura 21D**). Aunque detectamos la presencia de pT α en el compartimento de los endosomas tempranos (**Figura 21, A y B**), no ha sido posible analizar el porcentaje de colocalización con este orgánulo intracelular, debido al bajo marcaje con anti-EEA1 que presentan los timocitos.

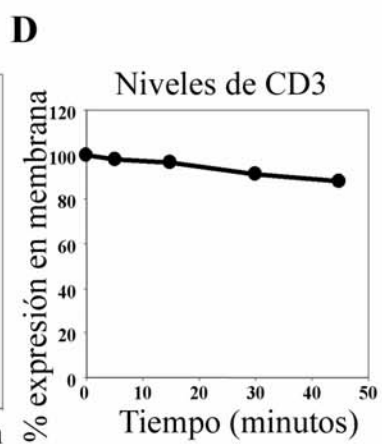
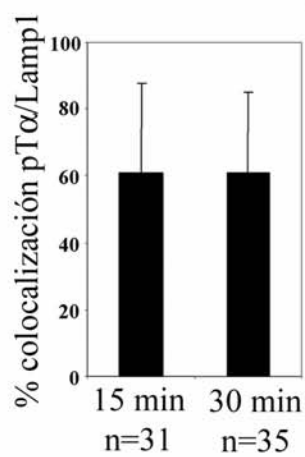
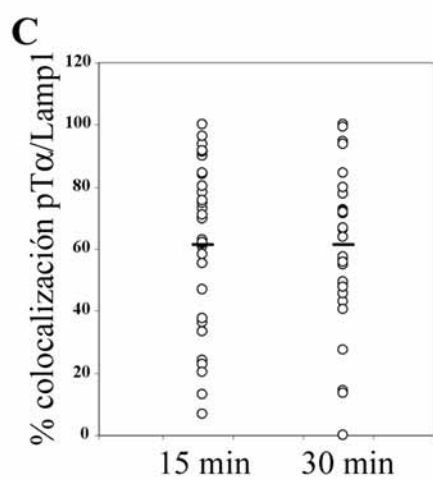
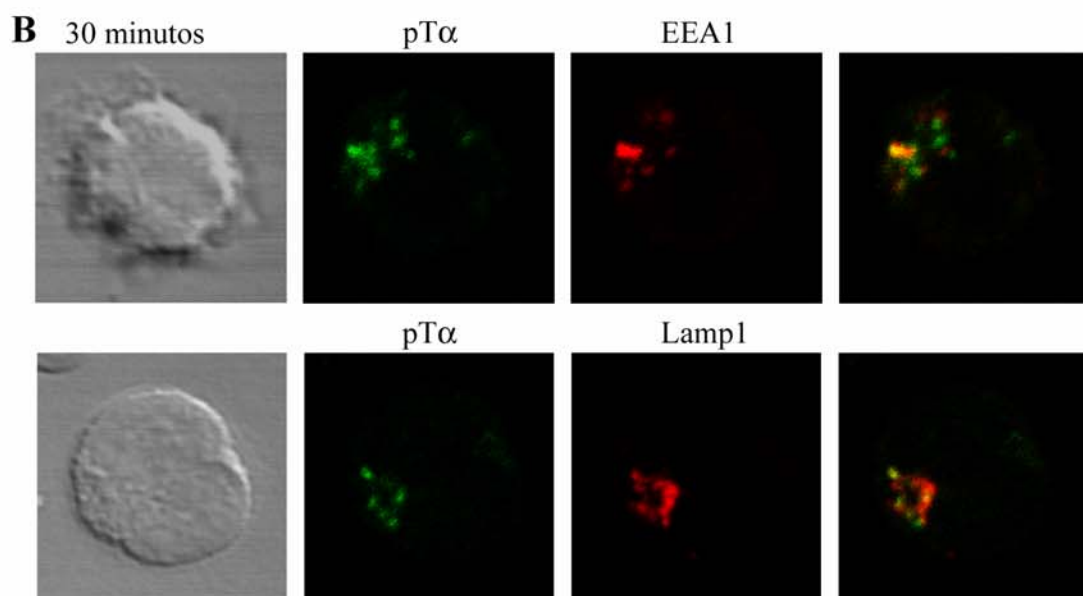
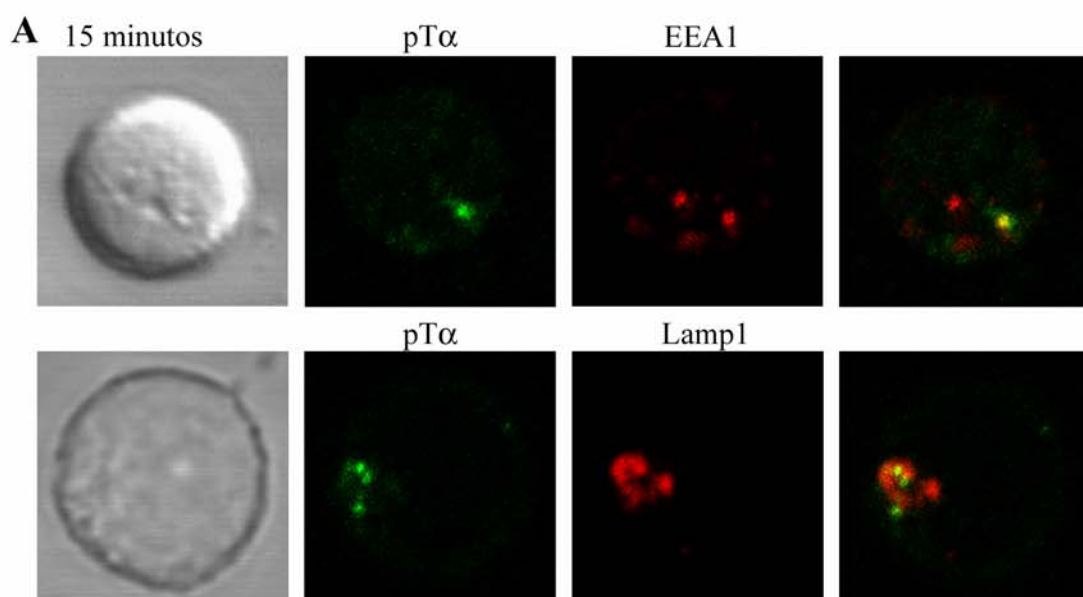


Figura 21. **Endocitosis de la cadena pT α en timocitos pre-TCR⁺ *ex vivo*.** Los timocitos pre-TCR⁺ se aislaron como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, y se marcaron con anti-pT α como se describe en la Figura 19 durante (A) 15 minutos o (B) 30 minutos. Los endosomas tempranos (anti-EEA1) se revelaron con anti-IgG1-Alexa555 y lisosomas (anti-Lamp1) con anti-IgG1-TxR. La marca de pT α se reveló con anti-IgG2a-FITC y anti-FITC-Alexa488. Las imágenes mostradas en (A) y (B) corresponden a una única sección de 1 μ m de grosor. C) Cuantificación de la colocalización entre pT α y Lamp1 (lisosomas). El porcentaje de colocalización se obtuvo según se explica en Materiales y Métodos. El segundo gráfico representa la media de colocalización de todas las células analizadas (n), \pm SD. Las imágenes y cuantificaciones son representativas de tres experimentos. D) Niveles de expresión de CD3 en los timocitos tratados con anti-pT α . A los tiempos indicados, las células se marcaron con anti-CD3 ϵ -PE y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de tres.

1.4.3. Implicación de las Src-quinasas y el citoesqueleto de actina en los procesos de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR.

Los datos obtenidos mediante microscopía confocal determinan que el complejo pre-TCR se transporta desde la membrana a los lisosomas rápidamente, de forma que, en aproximadamente 30 minutos, el pre-TCR que estaba en la membrana llega a los lisosomas y se degrada. El siguiente objetivo que nos planteamos fue determinar los mecanismos moleculares que están implicados en ese transporte.

La familia de proteínas Src-quinasas interviene en los primeros pasos de la activación tanto del pre-TCR como del TCR (Cheng y Chan, 1997; Groves *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2000). El papel de Src-quinasas en la internalización del complejo TCR ha sido un amplio campo de estudio. Aunque existe cierta controversia, se ha visto un papel activo de las Src-quinasas en la degradación del TCR activado (D'Oro *et al.*, 1997; Martin y Bevan, 1998). En el caso del complejo pre-TCR, datos generados por nuestro laboratorio y por otros grupos, mostraron que inhibidores específicos de la actividad Src-quinasa aumentan los niveles en membrana de los complejos pre-TCR humano y de ratón (Carrasco *et al.*, 2003; Panigada *et al.*, 2002), implicando a esta familia en la regulación de la expresión en membrana del complejo.

El citoesqueleto de actina dirige una gran cantidad de procesos celulares, entre ellos, la endocitosis de receptores de membrana, en la que podría intervenir a distintos niveles (Qualmann *et al.*, 2000). En el caso del pre-TCR de ratón, se ha visto que el

citoesqueleto de actina es necesario para la degradación del complejo (Panigada *et al.*, 2002).

Para abordar el papel de las Src-quinasas y del citoesqueleto de actina en el proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR se han seguido dos tipos de abordaje: la internalización del complejo desde la membrana se ha seguido mediante citometría de flujo, y la degradación se ha estudiado siguiendo el transporte hasta los lisosomas mediante microscopía confocal. Los estudios se realizaron en presencia de un inhibidor específico de la actividad de las Src-quinasas, el compuesto PP2, y de una droga que inhibe la polimerización del citoesqueleto de actina, la citocalasina D.

En primer lugar, quisimos saber si estas drogas afectaban a la dinámica de expresión en la membrana del complejo pre-TCR. Para ello, las células SupT1 se incubaron durante dos horas con cicloheximida, y después se añadieron los inhibidores PP2 o citocalasina D para determinar si la desaparición del complejo de la membrana se encontraba alterada. Como se muestra en la **Figura 22**, la presencia de PP2 retrasa la desaparición del complejo, mientras que la citocalasina D tiene no tiene apenas efecto sobre la desaparición del complejo de la membrana, aparte de una pequeña aceleración, que podría implicar al citoesqueleto en la baja tasa de reciclaje del complejo pre-TCR.

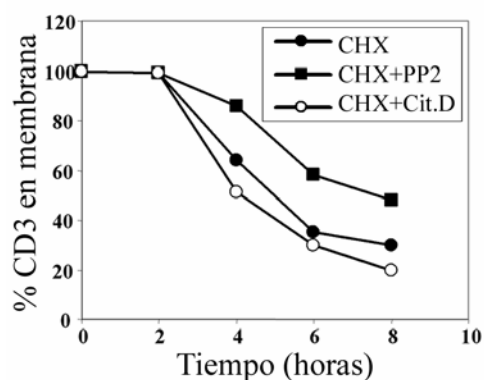


Figura 22. Efecto de las drogas PP2 y citocalasina D sobre la pérdida del complejo pre-TCR en presencia de cicloheximida. Las células SupT1 se pretrataron durante 2 horas con cicloheximida y después se añadieron los inhibidores PP2 o citocalasina D. Los niveles de expresión en membrana del complejo pre-TCR se determinaron por citometría de flujo con anti-CD3ε-APC a los tiempos indicados. Los porcentajes que se muestran están referidos a células sin tratar. Se muestra un experimento representativo de tres.

Para estudiar en detalle la internalización del complejo, y poder diferenciar entre el efecto sobre los procesos de entrada en la célula y el reciclaje de complejos a la membrana, las células se trataron durante 1 hora con los inhibidores PP2 o citocalasina D, y después se añadió brefeldina A. Según los datos que se muestran en la **Figura 23A**, ambas drogas retrasan la entrada del complejo pre-TCR en la célula. Otra manera de abordar el proceso de internalización mediante citometría de flujo consiste en marcar los complejos de la membrana con anticuerpos específicos, permitir la internalización de los anticuerpos poniendo las células a 37°C y analizar la velocidad de entrada de los anticuerpos midiendo la cantidad de anticuerpo primario que queda en la membrana con

anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo. La diferencia entre la media de fluorescencia inicial (tiempo 0) y los distintos tiempos refleja la proporción de anticuerpo internalizado. Las células SupT1 se pretrataron con PP2 o citocalasina D durante 1 hora, se marcaron con anti-CD3 ϵ (UCHT1) a 4°C, se lavaron y se pusieron a 37°C. A los tiempos indicados, los niveles de anti-CD3 ϵ que permanecen en la membrana se determinaron por citometría de flujo. En la **Figura 23B** se muestra que ambos inhibidores afectan a la internalización de anti-CD3, provocando un retraso en este proceso, aunque no un bloqueo. Este retraso es mayor en el caso del inhibidor de las proteínas Src-quinasa.

El conjunto de los datos mostrados en las **Figuras 22 y 23** demuestran que el proceso de internalización del complejo pre-TCR es parcialmente dependiente de la actividad de la familia Src-quinasa y de la integridad del citoesqueleto de actina. Además, puesto que efecto del PP2 parece más acusado en el caso de la cicloheximida (**Figura 22**) que en el caso de la brefeldina A (**Figura 23A**), las Src-quinasa parecen implicadas tanto en la internalización como en la baja tasa de reciclaje del pre-TCR. Sin embargo, ninguno de los inhibidores bloquea la internalización, únicamente se observa un retraso, lo que sugiere la implicación de mecanismos de regulación adicionales independientes de fosforilación vía Src-quinasa o de la polimerización de actina.

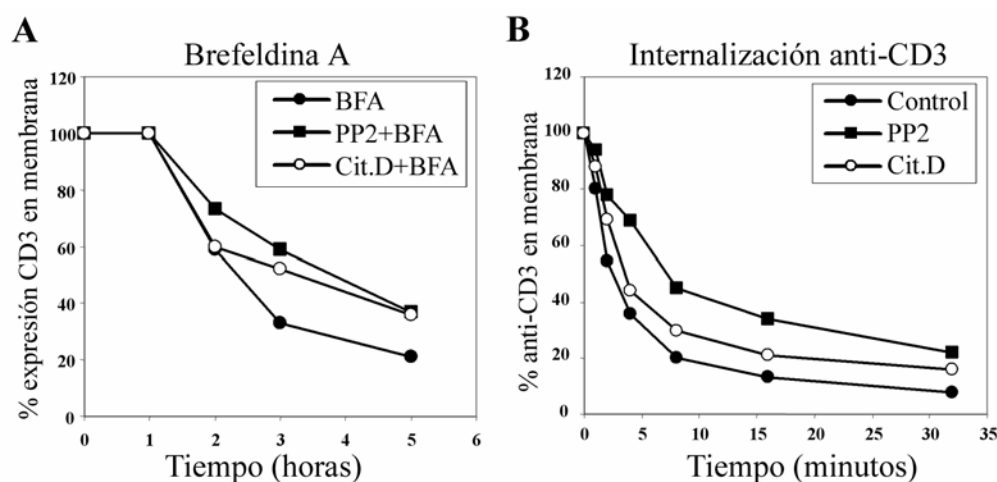
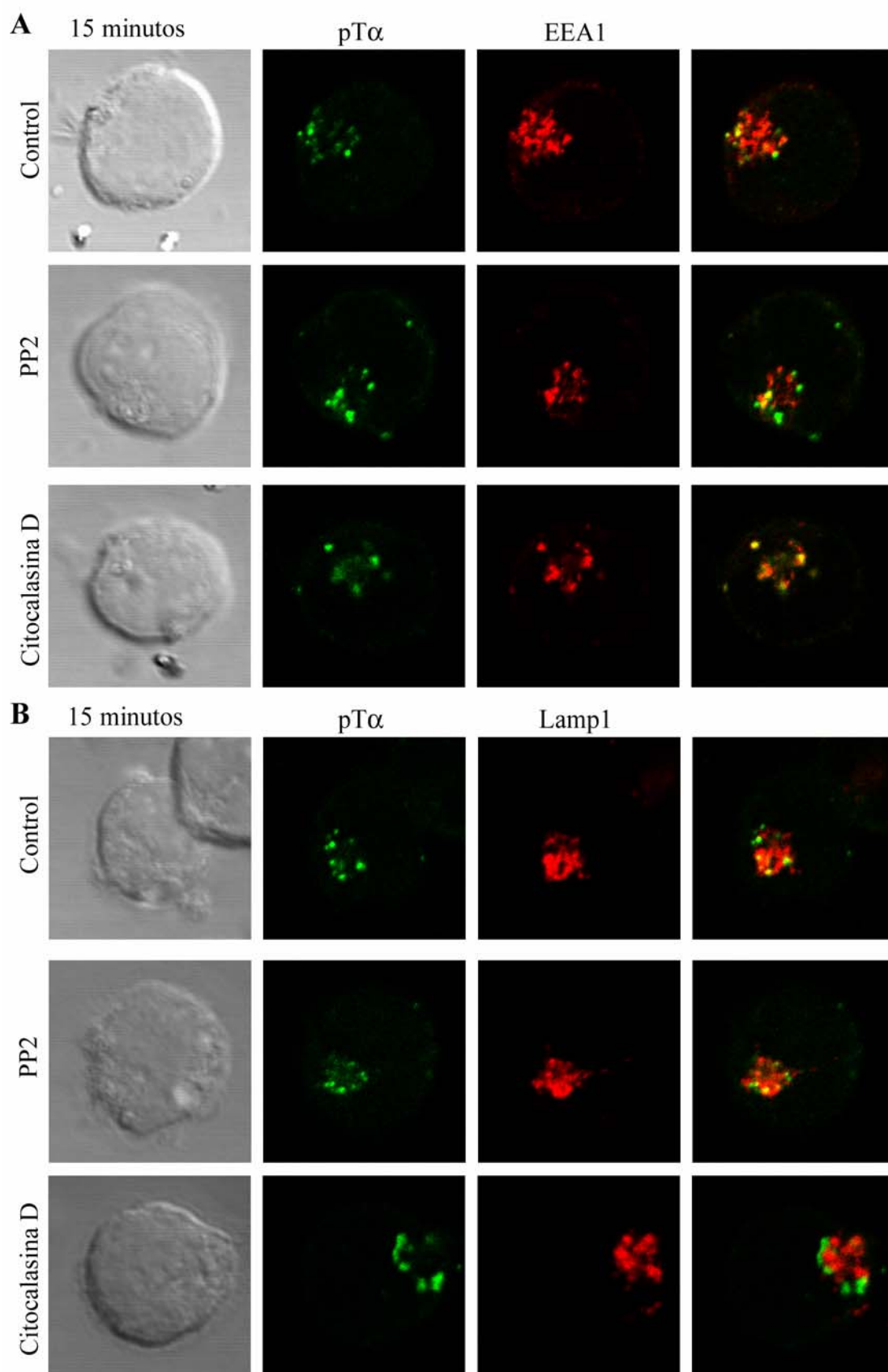


Figura 23. Efecto de las drogas PP2 y citocalasina D sobre la internalización del complejo pre-TCR. **A)** Las células SupT1 se incubaron con PP2 y citocalasina D (Cit.D) durante 1 hora antes de añadir la brefeldina A. Los niveles de expresión en membrana del complejo pre-TCR se determinaron por citometría de flujo con anti-CD3 ϵ -APC a los tiempos indicados. Los porcentajes que se muestran son relativos a las células con cada pretratamiento sin brefeldina A. **B)** Las células SupT1 se incubaron con anti-CD3 ϵ durante 30 minutos a 4°C, se pusieron a 37°C y el anticuerpo anti-CD3 ϵ remanente en la membrana se detectó por citometría de flujo con anti-IgG1-Alexa647 a los tiempos indicados. Los porcentajes son relativos a los niveles detectados a tiempo 0, como se explica en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de tres en ambos apartados.

Para estudiar el papel de las Src-quinasas y el citoesqueleto de actina en el transporte intracelular de los complejos una vez internalizados, recurrimos al análisis de la endocitosis de la cadena pT α en células tratadas con los inhibidores PP2 o citocalasina D mediante microscopía confocal. Las células SupT1 se pretrataron durante 1 hora con PP2, citocalasina D o se dejaron sin tratar y se procedió a su marcaje con anti-pT α según el esquema expuesto en la **Figura 19**, durante 15 minutos (**Figura 24, A y B**), seguido de una “caza” 15 minutos adicionales (**Figura 24, C y D**). Tras el marcaje con anti-pT α , se analizó la colocalización de pT α con endosomas tempranos y lisosomas. Tras los primeros 15 minutos de marcaje (**Figura 24, A y B**), no se observan grandes diferencias entre las células control y las células tratadas con PP2, ya que en ambos casos se detectan niveles similares de colocalización parcial de pT α con los endosomas tempranos y con los lisosomas. Sin embargo, en las células tratadas con citocalasina D, el marcaje para pT α parece retenido en los endosomas tempranos (**Figura 24A**, tercer panel) y excluido de los lisosomas (**Figura 24B**, tercer panel). Estas diferencias son aún más acusadas tras la segunda incubación de 15 minutos (**Figura 24, C y D**), donde se observa que pT α ha abandonado los endosomas tempranos y pasa a colocalizar mayoritariamente con los lisosomas en el caso de las células control y las células tratadas con PP2 (**Figura 24, C y D**, primer y segundo panel, respectivamente), mientras que en las células tratadas con citocalasina D (**Figura 24, C y D**, tercer panel), pT α está claramente retenido en los endosomas tempranos y es incapaz de progresar en su transporte hacia los lisosomas. Los porcentajes de colocalización de pT α con ambos orgánulos en estas condiciones se muestran en la **Figura 24E**. Estos datos demuestran de forma inequívoca que el transporte intracelular de la cadena pT α , una vez internalizada, es independiente de la actividad de las Src-quinasas, pero fuertemente dependiente de la presencia de un citoesqueleto de actina activo. En los porcentajes de colocalización analizados, las diferencias que se muestran entre las células control y las células tratadas con citocalasina D (**Figura 24E**) son extremadamente significativas en todos los casos, puesto que el análisis estadístico mediante t-test mostró un valor de $p < 0,0001$.

El conjunto de los datos expuestos en este apartado demuestran que la internalización y el transporte intracelular del complejo pre-TCR son dos procesos regulados de forma diferencial: mientras que el balance entre internalización y reciclaje es parcialmente dependiente de las proteínas Src-quinasas, el transporte intracelular que conduce el complejo hacia su degradación está regulado por el citoesqueleto de actina.



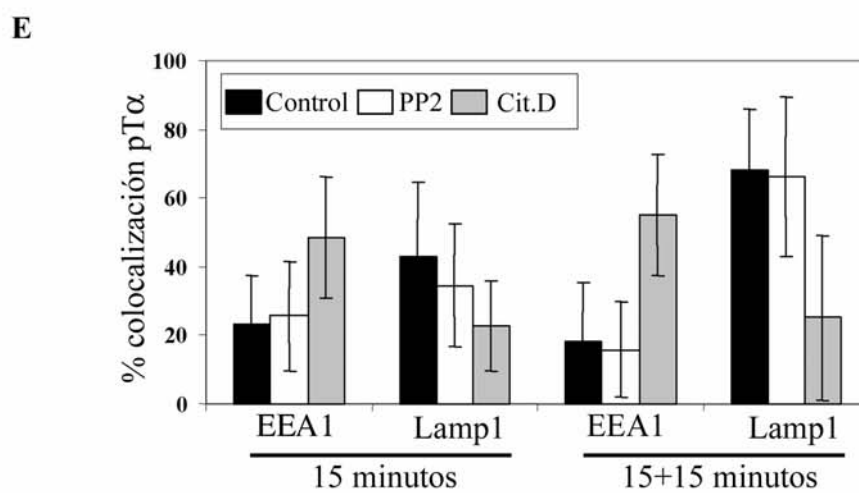
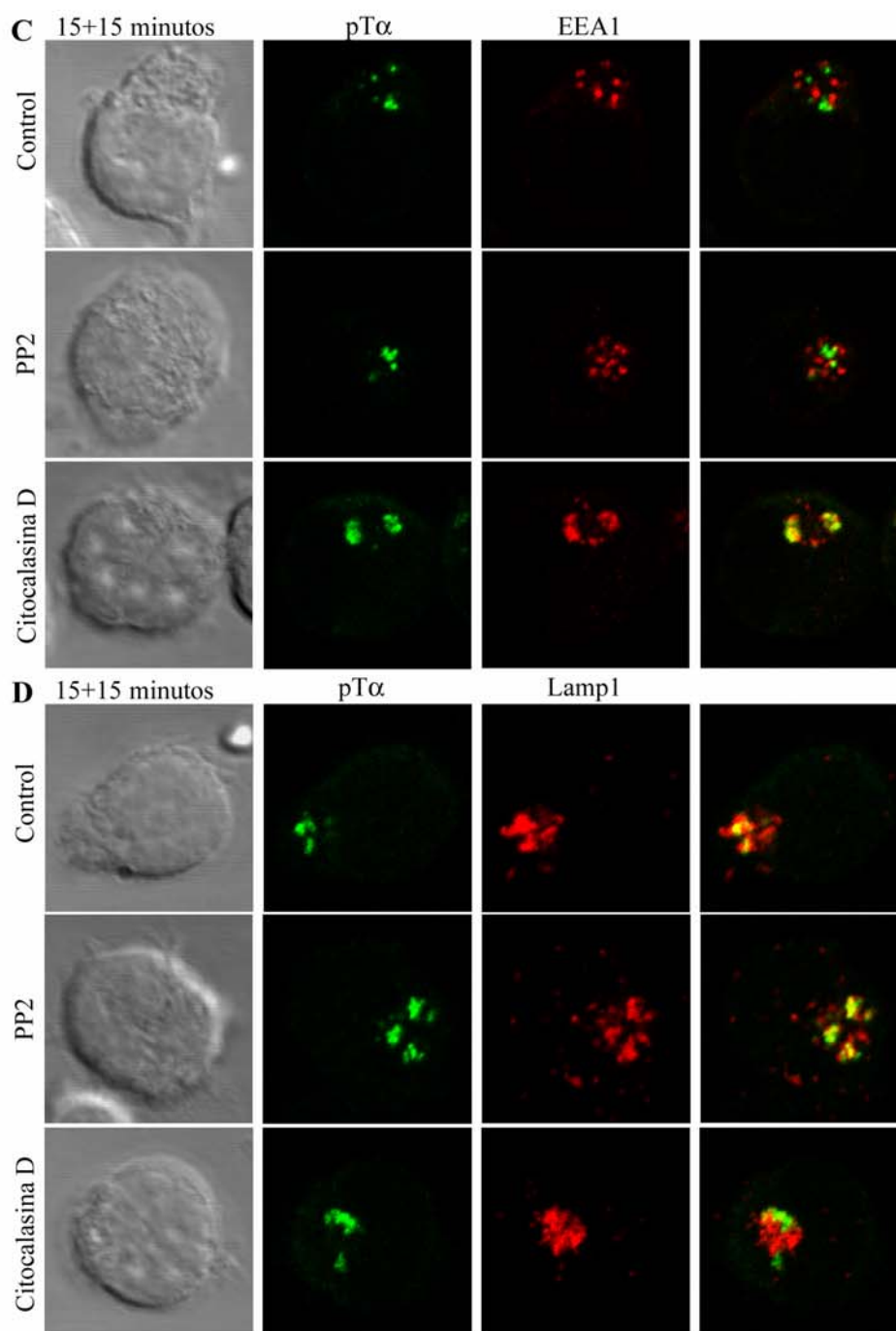


Figura 24. Efecto de las drogas PP2 y citocalasina D sobre el transporte intracelular de la cadena pT α . Las células SupT1 se trataron durante 1 hora con PP2, citocalasina D, o se dejaron sin tratar, antes de proceder a su marcaje con anti-pT α durante **(A y B)** 15 minutos o **(C y D)** 15+15 minutos, como se describe en la Figura 19. Las células se marcaron para endosomas tempranos (EEA1, A y C) o para lisosomas (Lamp1, B y D), revelados con anti-IgG1-Alexa555. La marca de pT α se reveló con anti-IgG2a-FITC y anti-FITC-Alexa488. Las imágenes mostradas corresponden a una única sección de 1 μ m de grosor. **E)** Cuantificación de la colocalización de pT α con EEA1 y Lamp1 en los distintos tiempos y tratamientos. El porcentaje de colocalización se obtuvo según se explica en Materiales y Métodos. El gráfico representa la media de colocalización de todas las células analizadas (n= 20-30 células en todos los casos), \pm SD. Se muestra un experimento representativo de tres.

2. IDENTIFICACIÓN DE ADAPTADORES INTRACELULARES DEL COMPLEJO pre-TCR

La visión más generalizada desde la identificación y clonaje del gen pT α en 1994 (Saint-Ruf *et al.*, 1994) sobre la función de la cadena pT α es que esta molécula constituye un componente meramente estructural del complejo pre-TCR, sin ningún papel biológico activo, aparte de permitir la expresión en membrana del complejo (Fehling *et al.*, 1997; Gibbons *et al.*, 2001). Sin embargo, nuestros datos sugieren una situación distinta, al menos para la molécula pT α humana, por lo que hemos propuesto que la cadena pT α tiene una función relevante y exclusiva en la regulación de la expresión en membrana del complejo pre-TCR (Carrasco *et al.*, 2002). Muy recientemente, esta visión se ha ampliado también al sistema de ratón, ya que se han publicado varios trabajos que demuestran que tanto el dominio extracelular como el intracelular de pT α son necesarios para el correcto desarrollo *in vivo* de los linfocitos T (Aifantis *et al.*, 2002; Yamasaki *et al.*, 2006). Con respecto al dominio intracelular de pT α , nuestros datos, expuestos en el apartado anterior de este trabajo indican que este dominio es responsable de la internalización y degradación constitutiva que sufre el complejo (Carrasco *et al.*, 2003). Por otro lado, los autores que inicialmente propusieron una función meramente estructural de la cadena pT α (Fehling *et al.*, 1997), han reportado recientemente la implicación del dominio intracelular de pT α en la señalización del pre-TCR de ratón (Aifantis *et al.*, 2002), por lo que nuestra hipótesis sobre la relevancia funcional del tallo intracelular de pT α parece confirmarse en ambas especies.

La cadena pT α humana posee un largo dominio intracelular de 114 aminoácidos (**Figura 25A**), mucho más largo que el equivalente en la cadena pT α de ratón, que posee 30 aminoácidos (**Figura 3**). Dentro del tallo citoplásmico de pT α existen varias secuencias ricas en prolina que podrían estar implicadas en la interacción con proteínas intracelulares y que podrían intervenir en la propagación de la señal del complejo pre-TCR. Sin embargo, hasta el momento no se ha identificado ninguna proteína capaz de interaccionar directamente con la cadena pT α . A pesar de que estos motivos ricos en prolina no cumplen las secuencias consenso clásicas (PXXP) para la interacción de proteínas con dominios SH3 o WW (Mayer, 2001), cada vez se conoce un mayor número de interacciones con motivos ricos en prolina basados en secuencias atípicas o no consenso. Dentro de los grupos ricos en prolina presentes en el dominio citoplásmico de pT α , uno de ellos está parcialmente conservado entre las cadenas pT α de ratón y humano (PPGRK, Pro3, **Figura 25A** y **Figura 3**), y además presenta cierta homología

con un motivo existente en la proteína CD2 de humano y de ratón (Aifantis *et al.*, 2002; Hayday *et al.*, 1999).

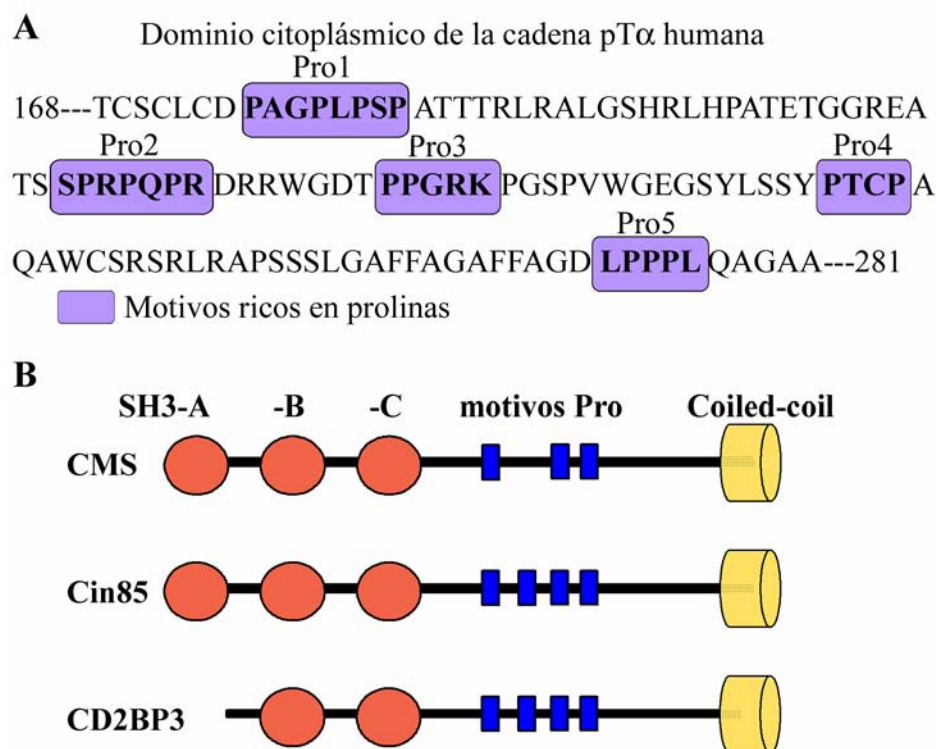


Figura 25. **A) Secuencia del dominio citoplásmico de pT α** , resaltando los motivos ricos en prolina. **B) Representación esquemática de la familia de proteínas CMS/Cin85.**

Los estudios más recientes en ratón han demostrado que la eliminación de una secuencia de la región intracelular de pT α que incluye este motivo conservado en la cadena pT α de ratón bloquea parcialmente el proceso de desarrollo de los linfocitos T y la señalización por el pre-TCR dependiente de calcio (Aifantis *et al.*, 2002). En el transcurso de este trabajo de Tesis Doctoral hemos identificado un motivo adicional de poli-prolinas-arginina en la cadena pT α humana (Pro2, **Figura 25A**), que no parece estar conservado en la cadena pT α de ratón. Aunque esta secuencia (SPRPQPR) no cumple el consenso PXXP de unión de dominios SH3, observamos que cumplía la secuencia de reconocimiento atípica recientemente descrita para los dominios SH3 de la familia de proteínas adaptadoras Cin85/CMS (PX(P/A)XXR o PXXXPR) (Kowanetz *et al.*, 2003; Kurakin *et al.*, 2003). Además, esta secuencia es similar a un motivo rico en prolina presente en el dominio citoplásmico del receptor CD2, que se une a la proteína CD2AP, el homólogo de CMS en ratón, y esta interacción CD2/CD2AP desempeña una importante función en el reclutamiento de CD2 y en la organización de la sinapsis inmunológica en las células T activadas (Dustin *et al.*, 1998), lo que sugiere la posible

implicación de esta familia de adaptadores en la función del pre-TCR. La familia de adaptadores Cin85/CMS está compuesta por tres miembros, CMS, Cin85 y CD2BP3 (**Figura 23B**). Este último componente procede de un procesamiento alternativo del RNA mensajero de Cin85. Las tres proteínas presentan una estructura bastante similar, con tres dominios SH3 en el extremo N-terminal (dos en el caso de CD2BP3), seguidos de varias secuencia ricas en prolina y finalmente un dominio *coiled-coil* en el extremo C-terminal (**Figura 25B**) (Dikic, 2002). Dentro del dominio citoplásmico de la cadena pT α existen otros motivos ricos en prolina aparte de los dos mencionados anteriormente (**Figura 25A**) entre los que destaca el motivo Pro5 (LPPL, **Figura 25A**), situado en la parte C-terminal de la proteína, por su elevado contenido en prolina.

2.1 Ligandos intracelulares de la cadena pT α : CMS y Cin85

Considerando los antecedentes expuestos, nuestro primer objetivo fue determinar la posible interacción entre la cadena pT α humana y las proteínas adaptadoras Cin85 y CMS. Para ello, realizamos ensayos de unión *in vitro* (*pull-down*), en los que construcciones del dominio intracelular de la cadena pT α fusionada a la proteína GST (GST-pT α), se incubaron con lisados de células COS7 transfectadas transitoriamente con Cin85 o CMS marcadas con el epítipo Flag, como se describe en Materiales y Métodos. Estos experimentos demostraron que las proteínas Cin85 y CMS interaccionan de forma específica con el dominio intracitoplásmico de la cadena pT α (**Figura 26A**).

Para analizar si esta interacción se produce en un entorno fisiológico, transfectamos de forma transitoria CMS-Flag en la línea pre-T SupT1. Las células se estimularon con anti-CD3 y anti-IgGs de ratón durante 5 minutos a 37°C, y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo contra el dominio citoplásmico de la cadena pT α (CT), y anti-TCR ζ . Como se observa en la **Figura 26B** (primer panel), CMS-Flag es coprecipitado con pT α tanto en condiciones de reposo como de estimulación, indicando que CMS y pT α interaccionan *in vivo*. Los niveles de CMS que se detectan son bastante bajos, acordes con los bajos niveles de expresión del complejo pre-TCR en la membrana celular. La activación con anti-CD3 no produce un aumento en la unión de CMS a pT α , lo que sugiere que la asociación no es inducible en las condiciones experimentales de estimulación empleadas. Las condiciones suaves de lisis usadas en estos experimentos mantienen la integridad del complejo pre-TCR, lo que nos permitió ver también la coprecipitación de CMS con la cadena TCR ζ (**Figura 26B**, primer panel).

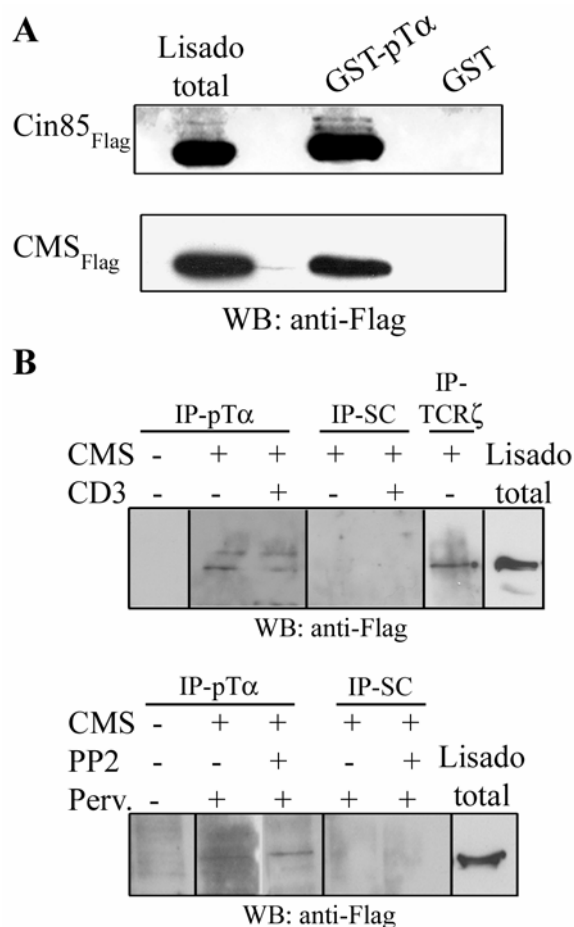


Figura 26. Interacción entre el dominio citoplásmico de pTα y las proteínas CMS y Cin85. **A)** Ensayos de unión *in vitro* entre el dominio citoplásmico de pTα fusionado a GST (GST-pTα) o la proteína GST y lisados procedentes de células COS7 transfectadas con Cin85-Flag o CMS-Flag. **B)** Las células SupT1 transfectadas transitoriamente con CMS-Flag o con el vector vacío (-), se estimularon con anti-CD3 (panel superior) o con pervanadato (perv., panel inferior), se lisaron y se inmunoprecipitaron con anti-pTα (CT) o anti-TCRζ. En el caso de la activación con pervanadato, la mitad de las células se habían pretratado con PP2. Como control negativo de la interacción se muestran los preclarados de los lisados con suero preinmune de conejo (SC) y proteína A-Sefarosa. Los inmunoprecipitados se resolvieron mediante *SDS-PAGEs* y *Western-Blot* con anti-Flag. Se muestra un experimento representativo de tres.

En el caso de otras proteínas que se unen a CMS y Cin85, como c-Cbl, se ha visto que, aunque la asociación está basada en interacciones SH3-prolinas, esta interacción está regulada por fosforilación de determinados residuos de tirosinas en c-Cbl (Kirsch *et al.*, 2001). Por ello, quisimos ver si la inducción de fosforilación en tirosinas afectaba de alguna manera a la unión entre CMS y pTα. Para ello, transfectamos las células SupT1 con CMS-Flag, y las tratamos con pervanadato (inhibidor de fosfatasa), que induce una acumulación de proteínas fosforiladas dentro de la célula. También nos interesaba saber si, en el caso de existir una dependencia de la fosforilación, estaba regulada de alguna manera por la familia de las Src-quinasa. Por ello, antes de activar las células con pervanadato, se pretrataron o no con PP2, inhibidor de Src-quinasa (en esta situación, a pesar de la adición del pervanadato, la fosforilación de los sustratos de las Src-quinasa estaría bloqueada). En la **Figura 26B** (segundo panel) se observa que la unión de CMS a pTα no aumenta tras el tratamiento con pervanadato, y tampoco se altera en presencia de PP2, por lo que la asociación entre pTα y CMS no parece estar regulada ni por fosforilación ni por Src-quinasa. Similares experimentos se llevaron a cabo para detectar la unión entre pTα y Cin85 *in vivo* sin

que se obtuvieran resultados positivos, lo que sugiere que la unión de pTα con Cin85 es de menor afinidad que con CMS.

2.2 Identificación de los motivos implicados en la interacción pTα-Cin85/CMS

Nuestro siguiente objetivo fue la identificación de los dominios concretos implicados en la interacción entre pTα y las proteínas Cin85/CMS. Para ello, nos basamos en los ensayos de unión *in vitro* con distintos mutantes de delección tanto para CMS y Cin85 como para pTα.

2.2.1 Cin85 y CMS interaccionan con el dominio citoplásmico de pTα mediante distintos motivos SH3

En primer lugar nos centramos en la identificación de los dominios específicos de las moléculas Cin85 y CMS implicados en la unión a pTα. En la **Figura 27 (A y C)**, se muestra un esquema de las construcciones de Cin85 y CMS usadas en estos ensayos. Estas construcciones se marcaron con el epítipo Flag en su extremo C-terminal, se transfectaron de forma transitoria en células COS7 y se ensayó su capacidad de unión *in vitro* a GST-pTα (**Figura 27, B y D**). Como se esperaba, sólo las construcciones que contenían motivos SH3 son capaces de unirse a pTα. Además, los datos muestran que la participación en la interacción de los dominios SH3 de Cin85 y CMS es distinta. En el caso de Cin85, las construcciones que contienen los SH3-ABC y -AB muestran una interacción mucho más fuerte con pTα que la proteína completa (**Figura 27B**, carriles 2 y 3 frente a 1), mientras que la construcción SH3-BC apenas se asocia a pTα (carril 4), lo que indica que es el dominio SH3A el principal implicado en la asociación a pTα. La baja asociación de Cin85 completo con respecto a los niveles que se detectan con las construcciones SH3ABC o AB podría deberse a que Cin85 presenta una asociación intramolecular autoinhibitoria en la que el dominio SH3A se une a uno de sus propios dominios ricos en prolina (Kowanetz *et al.*, 2003; Tibaldi y Reinherz, 2003), lo que impediría su interacción con pTα. En el caso de CMS, la unión más fuerte se detecta con la proteína completa, y sólo la construcción que contiene los dominios SH3-ABC es capaz de interaccionar con pTα (**Figura 27D**, carriles 1 y 2). Estos datos demuestran que los tres SH3 de CMS, o al menos los dominios SH3A y C son necesarios para la unión a pTα, puesto que no se detecta unión en las construcciones que carecen del dominio A o C (carriles 3 y 4). La diferencia entre la unión de la proteína completa o los tres SH3 indica que la parte C-terminal de CMS también participa de alguna manera en la interacción, probablemente debido a la capacidad de homodimerización de esta

proteína a través del dominio *coiled-coil* (Kirsch *et al.*, 1999). La diferencia de unión de CMS y Cin85 en sus formas completas sugiere que en una situación fisiológica, CMS tendría favorecida la unión a pT α frente a Cin85, lo que explicaría la dificultad de coimmunoprecipitar Cin85 con pT α .

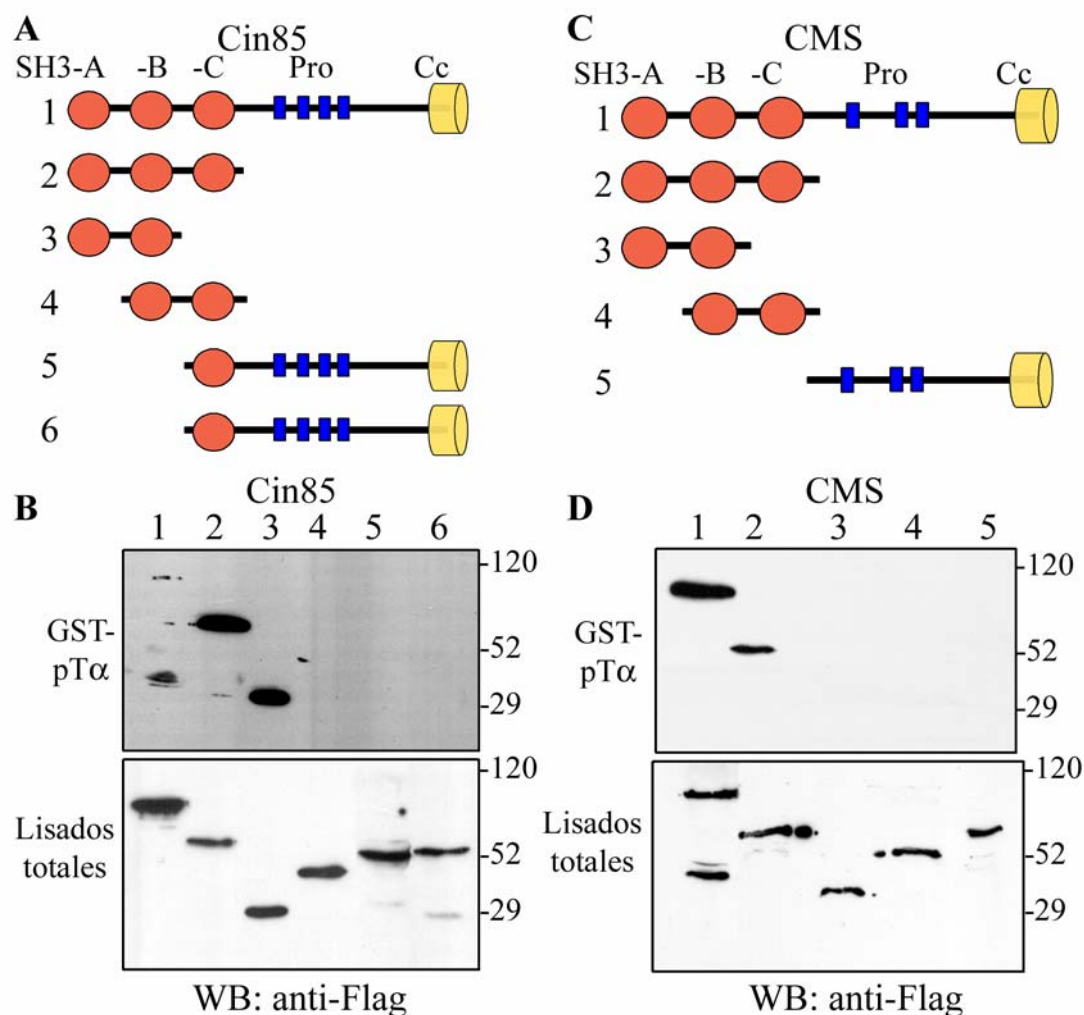


Figura 27. **Identificación de los dominios de CMS y Cin85 implicados en la interacción con pT α .** A) y C) Representación esquemática de las construcciones de Cin85 y CMS, respectivamente, usadas en este apartado. Todas estas construcciones presentan un epítipo Flag en el extremo C-terminal. B) y D) Las construcciones representadas en los apartados A) y C) se transfectaron en células COS7 y se realizó un ensayo de unión *in vitro* a GST-pT α . Las proteínas precipitadas se resolvieron mediante SDS-PAGEs y Western-Blot con anti-Flag. Como control de las eficiencias de transfección se muestra la expresión de las distintas construcciones en los lisados totales de las células COS7. Se muestra un experimento representativo de cuatro.

2.2.2 Identificación del motivo específico de unión a Cin85/CMS en el dominio intracelular de la cadena pT α humana

Para determinar el motivo al que se unen Cin85/CMS en el dominio citoplásmico de pT α se usaron construcciones con las deleciones que se muestran en la **Figura 28A**, fusionadas a la proteína GST. En estas construcciones se eliminó selectivamente bien la secuencia de poli-prolinas-arginina consenso para la unión de Cin85 y CMS (Pro2), o bien el motivo Pro3, que se encuentra conservado en la cadena pT α de ratón. La presencia de prolinas suele provocar giros en la estructura terciaria de las proteínas. Como control, para asegurar que las diferencias en la unión que se ven se deben a la eliminación de los motivos concretos y no a una alteración de la estructura terciaria de la proteína, también se eliminó el motivo Pro5, que presenta una alta densidad de prolinas. Las fusiones a GST de los mutantes de pT α se ensayaron con todas las construcciones de Cin85 y CMS que se muestran en la **Figura 27A y 27C**. Como se observa en la **Figura 28B**, ni la delección del motivo Pro3 ni la del Pro5 alteran la capacidad de unión de Cin85 o CMS a pT α , mientras que la eliminación del motivo Pro2, que cumple la secuencia consenso para unión a estas proteínas, inhibe totalmente la unión de ambas proteínas. Por tanto, Cin85, a través de su dominio SH3A, y CMS, a través de sus tres dominios SH3, interaccionan con el mismo motivo rico en prolinas en pT α .

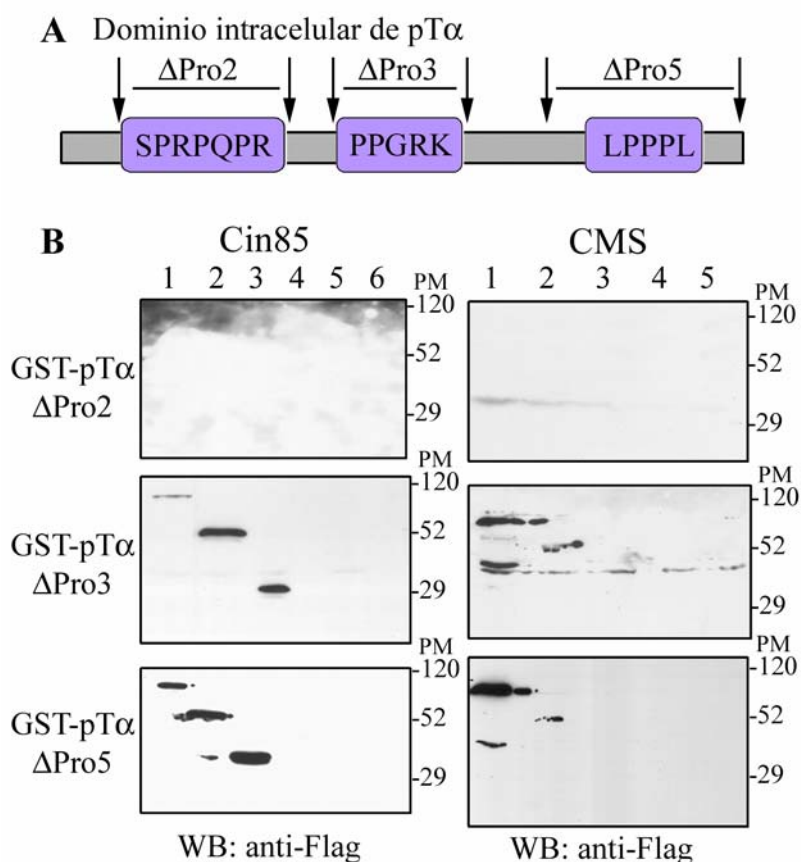


Figura 28. Identificación del motivo específico de pT α implicado en la interacción con CMS y Cin85. A) Representación esquemática del dominio citoplásmico de pT α

con la secuencia de los motivos ricos en prolina (Pro2, Pro3 y Pro5) analizados. Las flechas indican las secuencias eliminadas. **B)** El dominio citoplásmico de pTα con las delecciones indicadas en A se fusionó a GST (GST-pTαΔPro2, -pTαΔPro3 y -pTαΔPro5). Se ensayó su capacidad de unión *in vitro* a las construcciones de Cin85 (paneles izquierdos) y CMS (paneles derechos) mostradas en la Figura 23A y 23C. Las proteínas precipitadas se resolvieron mediante *SDS-PAGEs* y *Western-Blot* con anti-Flag. Se muestra un experimento representativo de tres con cada construcción GST-pTα.

2.2.3 La proteína CD2BP3 se recluta a pTα mediante su asociación con CMS y Cin85

Los resultados obtenidos en el apartado anterior muestran que el dominio SH3A de Cin85 es necesario para su interacción con el motivo Pro2 en el dominio citoplásmico de pTα. Por tanto, CD2BP3, la isoforma de Cin85 que carece del dominio SH3A (**Figura 25B**), no se uniría o interaccionaría de forma ineficiente con la cadena pTα. Para comprobar esta hipótesis, ensayamos *in vitro* la capacidad de unión de la construcción CD2BP3-Flag a GST-pTα. En la **Figura 29A** se observa que CD2BP3, incluso en condiciones de sobreexpresión, interacciona ineficientemente con el dominio intracelular de pTα. Puesto que CMS y CD2BP3 pueden heterodimerizar gracias a las interacciones que se establecen entre los dominios *coiled-coil* (Dikic, 2002; Watanabe *et al.*, 2000), quisimos determinar si estos dímeros podrían reclutarse a la cadena pTα, o por el contrario, si la existencia de los dímeros alteraría la unión de CMS a pTα. Con este fin, realizamos ensayos de unión *in vitro* a GST-pTα con CMS-Flag y cantidades crecientes de CD2BP3-Flag. Los resultados obtenidos muestran que la unión de CMS a pTα es independiente de la presencia de CD2BP3, puesto que la cantidad de CMS coprecipitada con GST-pTα es equivalente en ausencia o en presencia de las cantidades crecientes de CD2BP3 usadas en el ensayo (**Figura 29B**). Por tanto, CD2BP3 no es capaz de desplazar la unión de CMS a pTα. Por el contrario, la cantidad de CD2BP3 coprecipitada con CMS se incrementa de manera dependiente de dosis en estos ensayos, lo que indica que CD2BP3 es reclutado a pTα mediante su unión a CMS (comparar **Figura 29A** con **29B**). Realizamos experimentos similares para determinar si también Cin85 era capaz de reclutar a CD2BP3 al tallo intracelular de pTα. En este caso, puesto que Cin85 y CD2BP3 tienen un tamaño molecular similar, usamos cantidades crecientes de una construcción de Cin85 marcada con el epítipo HA, y CD2BP3-Flag. En la **Figura 29C** se observa que, al igual que ocurría con CMS, CD2BP3 interacciona con pTα en presencia de Cin85 de manera dependiente de dosis. En conclusión, tanto CMS como Cin85 son capaces de mediar el reclutamiento de CD2BP3 a la cadena pTα.

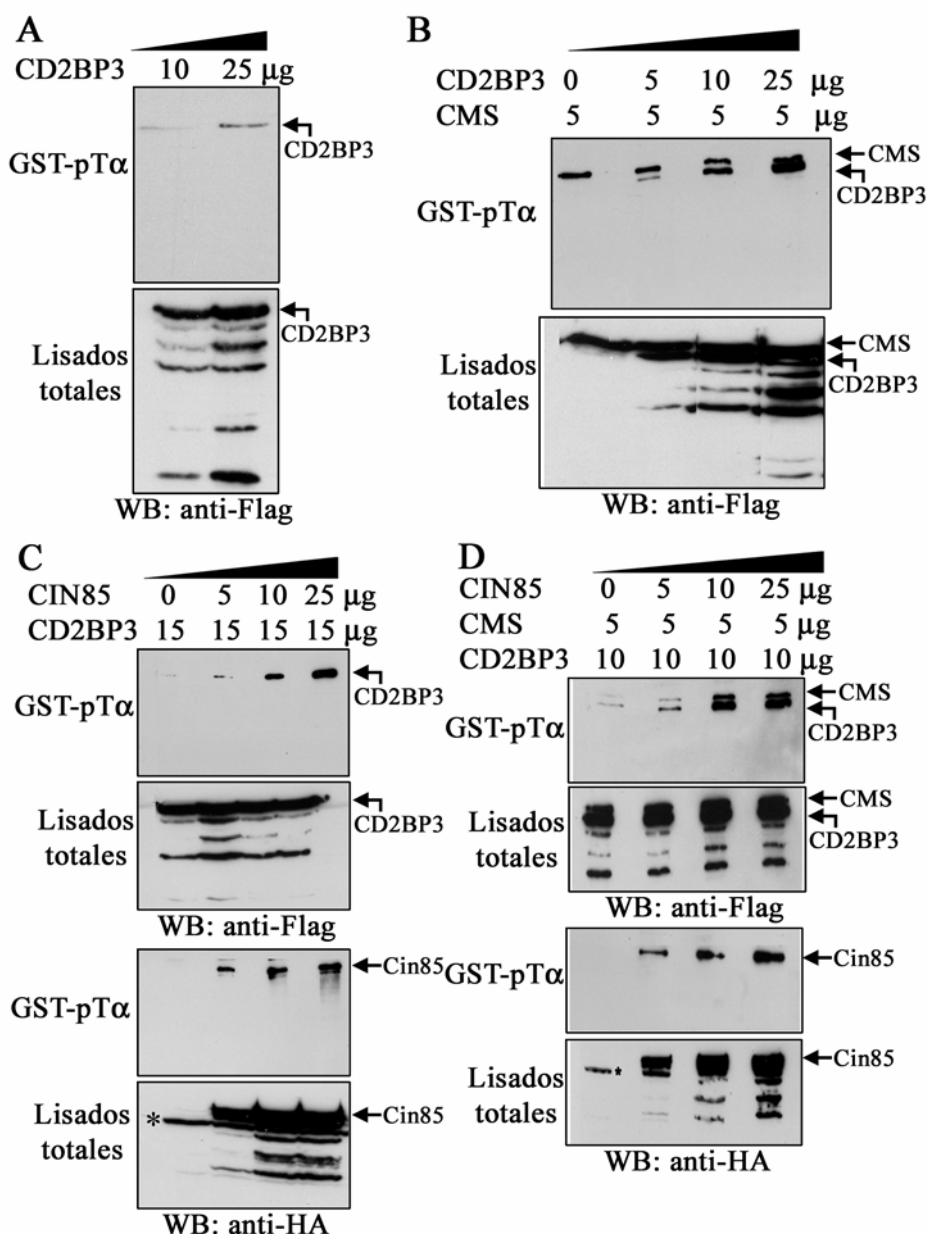


Figura 29. **Reclutamiento de CD2BP3 a pT α a través de su unión a CMS y Cin85.**

A) Las células COS7 se transfectoron con las cantidades indicadas de CD2BP3-Flag y se realizó un ensayo de unión *in vitro* a GST-pT α . **B)** Las células COS7 se cotransfectaron con una cantidad fija de CMS-Flag (5 μ g) y las cantidades indicadas de CD2BP3-Flag, y se ensayó la unión *in vitro* a GST-pT α . **C)** Las células COS7 se cotransfectaron con una cantidad fija de CD2BP3-Flag (15 μ g) y las cantidades indicadas de Cin85-HA, y se realizó un ensayo de unión *in vitro* a GST-pT α . **D)** Las células COS7 se cotransfectaron con una cantidad fija de CD2BP3-Flag (10 μ g) y CMS-Flag (5 μ g) y las cantidades indicadas de Cin85-HA, y se realizó un ensayo de unión *in vitro* a GST-pT α . En todos los apartados, las proteínas precipitadas y los lisados totales se resolvieron mediante SDS-PAGEs y Western-Blot con anti-Flag (para detectar CMS-Flag y CD2BP3-Flag) o con anti-HA (para detectar Cin85-HA). Como control de las eficiencias de transfección se muestra la expresión de las distintas construcciones en los lisados totales de las células COS7. El asterisco (*) en C) y D) señala una banda inespecífica reconocida por el anticuerpo anti-HA. Se muestra un experimento representativo de tres.

Los datos mostrados en este apartado revelan un nuevo escenario en relación a las asociaciones de pT α con la familia de adaptadores Cin85/CMS: la posible competición entre CMS y Cin85 por la unión a pT α y/o el reclutamiento de CD2BP3. Para investigar esta hipótesis, realizamos ensayos de unión *in vitro* a GST-pT α y lisados procedentes de células COS7 transfectadas con CMS-Flag, CD2BP3-Flag y cantidades crecientes de Cin85-HA. En la **Figura 29D** se muestra que la presencia de Cin85 no desplaza la unión de CMS a pT α ni el reclutamiento de CD2BP3. Por el contrario, las cantidades de CMS y CD2BP3 coprecipitadas con pT α aumentan en presencia de cantidades crecientes de Cin85. El conjunto de resultados mostrados en este apartado apoyan la existencia de complejos multiproteicos compuestos por CMS, Cin85 y CD2BP3, que son reclutados al dominio citoplásmico de la cadena pT α debido a las interacciones que se establecen entre los motivos *coiled-coil*.

2.3 Regulación diferencial de la expresión de los genes de Cin85 y CMS durante el desarrollo intratímico humano

La familia de adaptadores Cin85/CMS se expresa de forma ubicua en todos los tejidos (Gout *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha observado cierta regulación transcripcional para alguno de los miembros de esta familia en el desarrollo de determinados tejidos y órganos. Concretamente la expresión de CD2AP, la proteína homóloga a CMS en ratón, está regulada durante el desarrollo del riñón, órgano cuya función es dependiente de la presencia de CD2AP (Lehtonen *et al.*, 2000; Shih *et al.*, 1999). Para determinar la relevancia de Cin85/CMS en la función del pre-TCR, analizamos la expresión de estos genes en timocitos humanos en los distintos estadios de la diferenciación intratímica. Puesto que la expresión del pre-TCR está restringida a un estadio muy concreto y depende de la regulación transcripcional de pT α (Ramiro *et al.*, 1996; Saint-Ruf *et al.*, 1994), analizamos paralelamente la expresión de Cin85/CMS y pT α . Para ello, usamos técnicas de *Northern-Blot* sobre muestras de RNA mensajero obtenidas de las diferentes subpoblaciones tímicas (**Figura 30A** y **Figura 1**): Pre- β , que incluye las poblaciones DN y CD4ISP, pre-TCR⁺, que representa la población DP CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁻, Post- β (DP CD3⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁻), población en la que se inician los reordenamientos de TCR α , y las poblaciones DP y SP TCR $\alpha\beta$ ⁺. La línea SupT1 se incluyó en este estudio como control positivo de expresión de pre-TCR. Como se observa en la **Figura 30B**, la transcripción de pT α es máxima en las etapas previas a la expresión del complejo pre-TCR (Pre- β), decae en la población pre-TCR⁺ y es mínima en los timocitos que se han seleccionado (Post- β), hasta ser prácticamente indetectable en poblaciones posteriores como las DP y SP, en las que ya se detecta el RNA mensajero de TCR α . Estas poblaciones se analizaron de forma simultánea con sondas

específicas para Cin85 y CMS, que revelaron un transcrito de 4,6 Kb para CMS y 3,4 Kb para Cin85. La sonda para Cin85, que reconoce la parte C-terminal de la proteína, también mostró una banda adicional de 2,7 Kb que corresponde al procesamiento alternativo CD2BP3 (**Figura 30B**). Los resultados mostrados en la **Figura 30B** indican una regulación diferencial de los tres miembros de la familia Cin85/CMS durante el desarrollo intratímico humano. Las cantidades relativas de los RNA mensajeros de cada una de las proteínas, normalizadas para la cantidad de β -actina en cada caso (**Figura 30C**), muestran que la expresión de Cin85 y CD2BP3 se mantiene prácticamente constante a lo largo del desarrollo. Sin embargo, los niveles de transcripción de CMS aumentan en las células pre-TCR⁺ y Post- β , y decrecen en las poblaciones posteriores (DP y SP). De acuerdo con el incremento en los niveles de transcripción observado para CMS en las etapas de la selección β (pre-TCR⁺ y Post- β), los niveles relativos de CMS en la línea SupT1 son altos. Estos resultados indican que la transcripción de CMS se aumenta específicamente en las células pre-T que son las células diana *in vivo* de la señalización a través del pre-TCR y la selección β , lo que sugiere la participación de CMS en la función del pre-TCR.

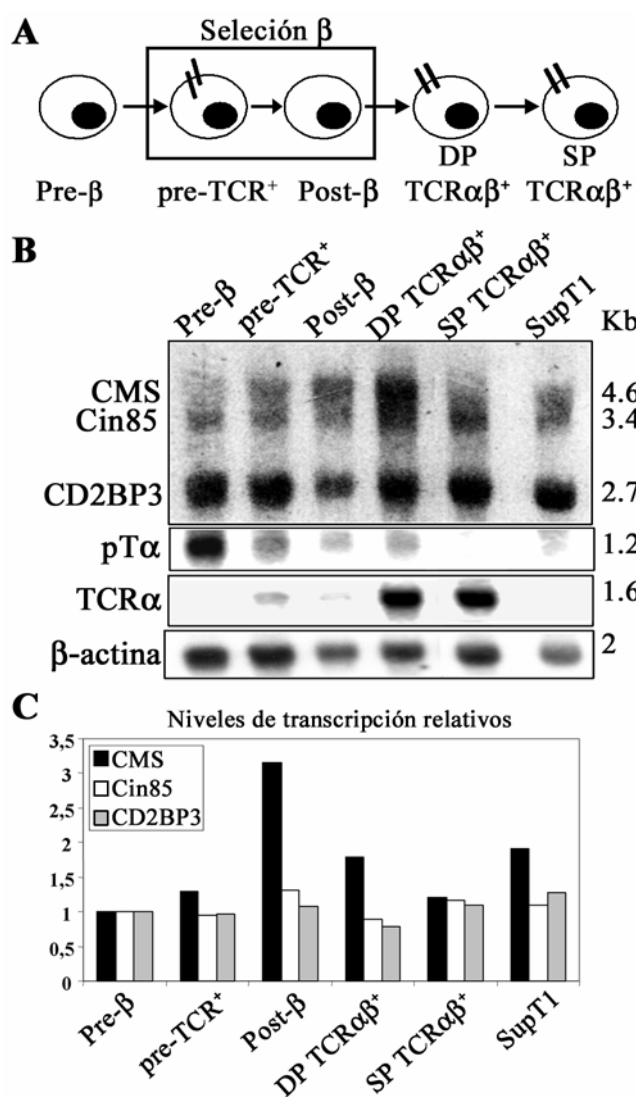


Figura 30. Regulación diferencial de la transcripción de los genes Cin85/CMS durante el desarrollo intratímico humano.

A) Representación esquemática de las diferentes poblaciones de timocitos analizadas para la expresión de Cin85/CMS. **B)** El RNA total de las poblaciones indicadas resueltas mediante *Northern-Blot* se hibridaron simultáneamente con sondas para Cin85 y CMS, y después se hibridaron de forma consecutiva con sondas para detectar pT α , TCR α y β -actina. **C)** Las cantidades de Cin85, CMS y CD2BP3 se normalizaron para la cantidad de β -actina. Los niveles de transcripción se muestran en unidades arbitrarias y son relativos a los valores obtenidos para la población más inmadura, Pre- β .

2.4 Estudio dinámico de la interacción entre CMS y pT α

Los datos obtenidos hasta ahora mostraban una interacción física entre pT α y CMS tanto *in vitro* como *in vivo*. Para determinar el papel de esta asociación en la función del pre-TCR, quisimos estudiar la interacción entre ambas moléculas en un contexto fisiológico y desde un punto de vista más dinámico.

2.4.1 Distribución intracelular de CMS: localización en los compartimentos endocíticos de células pre-T humanas

Se ha descrito la distribución intracelular de CMS/CD2AP en células T maduras de ratón (Badour *et al.*, 2003; Zaru *et al.*, 2002), en las que CD2AP presenta un patrón difuso en el citosol, pero se desconoce la localización subcelular de CMS en células pre-T humanas. Por tanto, nuestro primer objetivo fue determinar la distribución intracelular de CMS en células pre-TCR⁺ en condiciones de reposo. Para ello, usamos una construcción quimérica de CMS fusionada a la proteína verde fluorescente (CMS-GFP), transfectada de forma transitoria en la línea pre-T SupT1. Observamos que CMS-GFP, además de localizarse formando un halo difuso que rodea la célula (probablemente un compartimento citosólico cercano a la membrana), similar al detectado para células T maduras (Zaru *et al.*, 2002), se distribuye mayoritariamente en una serie de acúmulos intracelulares de forma vesicular (**Figura 31**, panel superior). En la **Figura 31** se observa que CMS colocaliza fuertemente con actina polimerizada (F-actina), sobre todo en las vesículas intracelulares de CMS, pero también en la zona cercana a la membrana. CMS contiene cuatro motivos de unión a actina (Dikic, 2002; Lehtonen *et al.*, 2002), además de interactuar de forma directa con proteínas que regulan el citoesqueleto de actina como CAPZ y cortactina (Hutchings *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2003). Todos estos motivos se encuentran en la parte C-terminal, entre los motivos ricos en prolina y el dominio *coiled-coil*. Estos datos, junto con la fuerte colocalización observada entre CMS y la actina polimerizada, sugieren que CMS está unido al citoesqueleto de actina en células pre-T. En efecto, cuando analizamos la distribución subcelular de una construcción de CMS que contiene únicamente los tres dominios SH3 (SH3-ABC-GFP) observamos una distribución intracelular homogénea, incluido el núcleo, pero no detectamos acumulación en las estructuras vesiculares en las que la molécula CMS completa colocaliza con la actina polimerizada (**Figura 31**, segundo panel). Por el contrario, el análisis de la distribución de una construcción de CMS que contiene exclusivamente el dominio C-terminal fusionado a GFP (Ct-GFP), mostró que aunque esta construcción presenta un patrón ligeramente más difuso en el citosol que la proteína completa, su presencia es mayoritaria en las vesículas que contienen actina polimerizada (**Figura 31**, tercer panel). Por tanto, la parte C-terminal de la proteína CMS es

responsable de su colocalización con el citoesqueleto de actina en vesículas intracelulares.

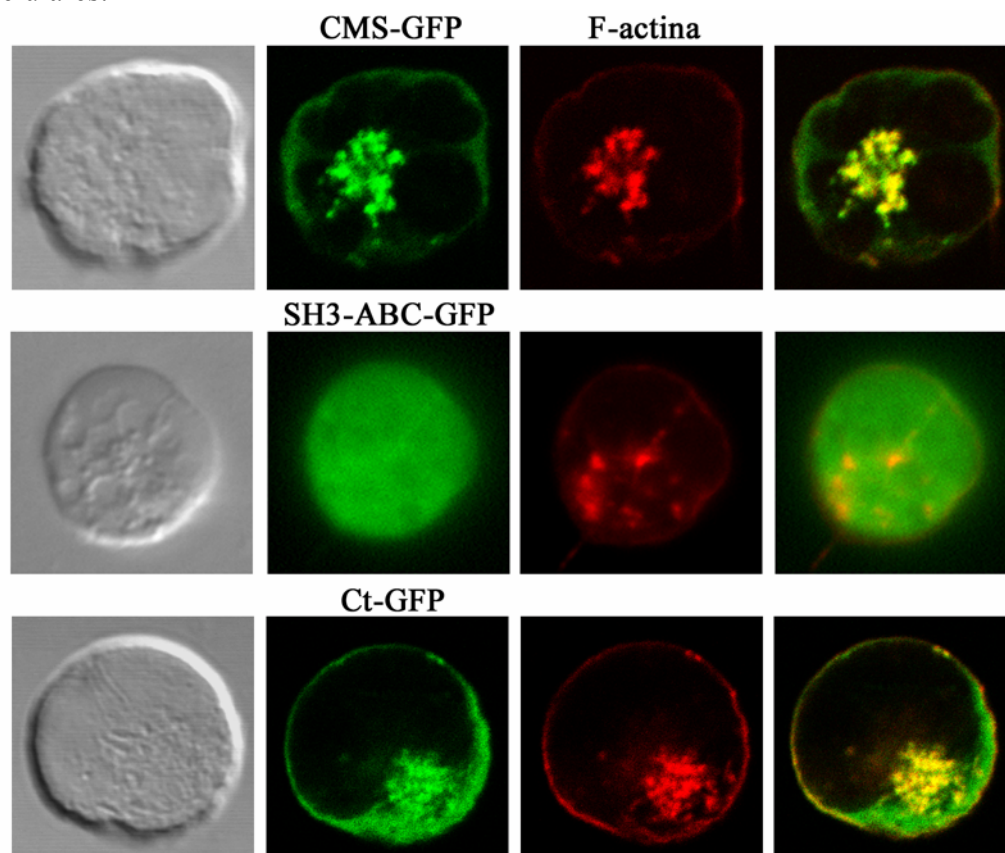


Figura 31. **Distribución intracelular de la construcción quimérica CMS-GFP: relación con el citoesqueleto de actina.** Las células SupT1 transfectadas en transitorio con CMS-GFP (primer panel), con SH3-ABC-GFP (segundo panel) o Ct-GFP (tercer panel) se fijaron y marcaron con Faloidina-TRITC para detectar la actina polimerizada (F-actina).

Para saber que tipo de vesículas contenían CMS, analizamos su colocalización con varios marcadores de orgánulos intracelulares (**Figura 32**) como los endosomas tempranos (con anti-EEA1, primer panel), endosomas tardíos-lisosomas (con anti-CD63, segundo panel) y lisosomas (con anti-Lamp1, tercer panel). Mediante estas tinciones, determinamos que CMS colocaliza en parte con vesículas de la ruta endocítica, en los endosomas tempranos y tardíos (por su colocalización parcial con EEA1 y CD63), pero parece excluido del compartimento lisosomal (**Figura 32**).

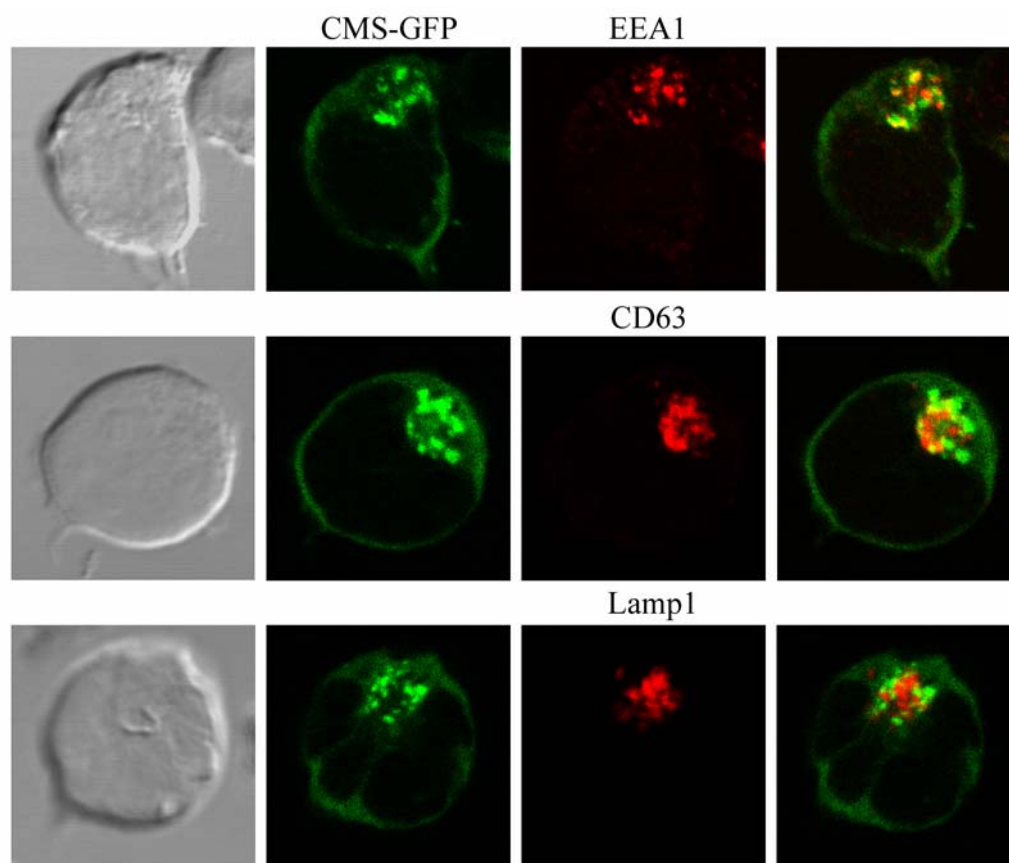


Figura 32. **Distribución intracelular de la construcción quimérica CMS-GFP: localización en la ruta endocítica.** Las células SupT1 transfectadas de forma transitoria con CMS-GFP se fijaron y marcaron con anti-EEA1 (primer panel), anti-CD63 (segundo panel) y anti-Lamp1 (tercer panel), revelados con anti-IgGs de ratón acopladas a Alexa555 para detectar endosomas tempranos, tardíos y lisosomas, respectivamente.

2.4.2 Reclutamiento de CMS y del citoesqueleto de actina al sitio de activación del complejo pre-TCR

Se ha descrito que la proteína homóloga a CMS en ratón, CD2AP, interacciona con CD2 y su participa en la organización de la sinapsis inmunológica (Dustin *et al.*, 1998). Además, CD2AP es reclutado por CD2 a la sinapsis inmunológica durante la activación de los linfocitos T (Badour *et al.*, 2003; Zaru *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta estos datos, analizamos la distribución de CMS durante la activación del complejo pre-TCR. Las células SupT1 transfectadas transitoriamente con CMS-GFP se marcaron en superficie con anti-CD3 ϵ seguido de un anticuerpo secundario anti-IgGs acoplado al fluorocromo Alexa555 a 4°C, se incubaron posteriormente durante 2 minutos a 37°C, y se analizaron mediante microscopía confocal. Como se observa en la **Figura 33**, en estas condiciones de activación se induce la agregación del complejo pre-

TCR en la membrana de modo similar al descrito para el TCR. Además, CMS se recluta a la zona donde se acumula el complejo pre-TCR, colocalizando con CD3 en esa zona, lo que sugiere una relación funcional entre la activación del pre-TCR y CMS.

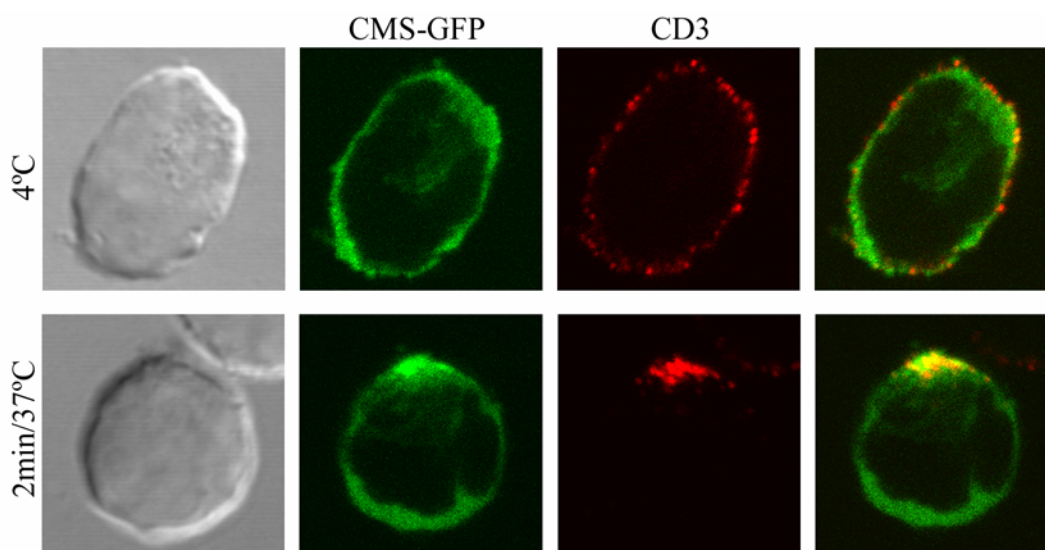


Figura 33. Reclutamiento de CMS a la zona de activación del complejo pre-TCR. Las células SupT1 transfectadas en transitorio con CMS-GFP se incubaron con anti-CD3 ϵ seguido de anti-IgGs de ratón acopladas a Alexa555 a 4°C, y se activaron durante 2 minutos a 37°C. Las células se analizaron mediante microscopía confocal, y las imágenes que se muestran corresponden a una única sección de 1 μ m de grosor. Se muestran imágenes representativas de dos experimentos independientes.

Para confirmar que CMS se recluta a la zona de activación del complejo pre-TCR, y teniendo en cuenta la fuerte colocalización observada entre CMS y actina polimerizada en las células en condiciones de no estimulación (**Figura 31**, primer panel), decidimos analizar la distribución de ambas proteínas tras la activación. Para activar las células usamos microesferas magnéticas recubiertas de anti-CD3 ϵ , incubadas durante 5 o 15 minutos a 37°C. En las imágenes que se muestran en la **Figura 34A**, se observa claramente que tanto CMS como el citoesqueleto de actina se movilizan hacia la zona de contacto de la célula con la esfera, donde colocalizan fuertemente. Se observan dos tipos de reclutamiento de CMS y actina: el primero parece proceder de la zona cercana a la membrana (**Figura 34A**, segundo panel), y el segundo aparece en forma de vesículas que rodean la bola (**Figura 34A**, tercer panel). Aunque ambos patrones se observan a los dos tiempos de activación analizados, el porcentaje de células con uno u otro tipo de reclutamiento cambia en función del tiempo, siendo el reclutamiento de “membrana” mayoritario a tiempos cortos, y el reclutamiento de vesículas el principal a tiempos más largos (**Figura 34B**). Estos datos sugieren que CMS y el citoesqueleto de actina se reclutan en dos pasos, en primer lugar se reclutan

las proteínas cercanas a la membrana, y después este patrón evoluciona hacia la formación o reclutamiento de vesículas que se acumulan en el sitio de agregación del pre-TCR.

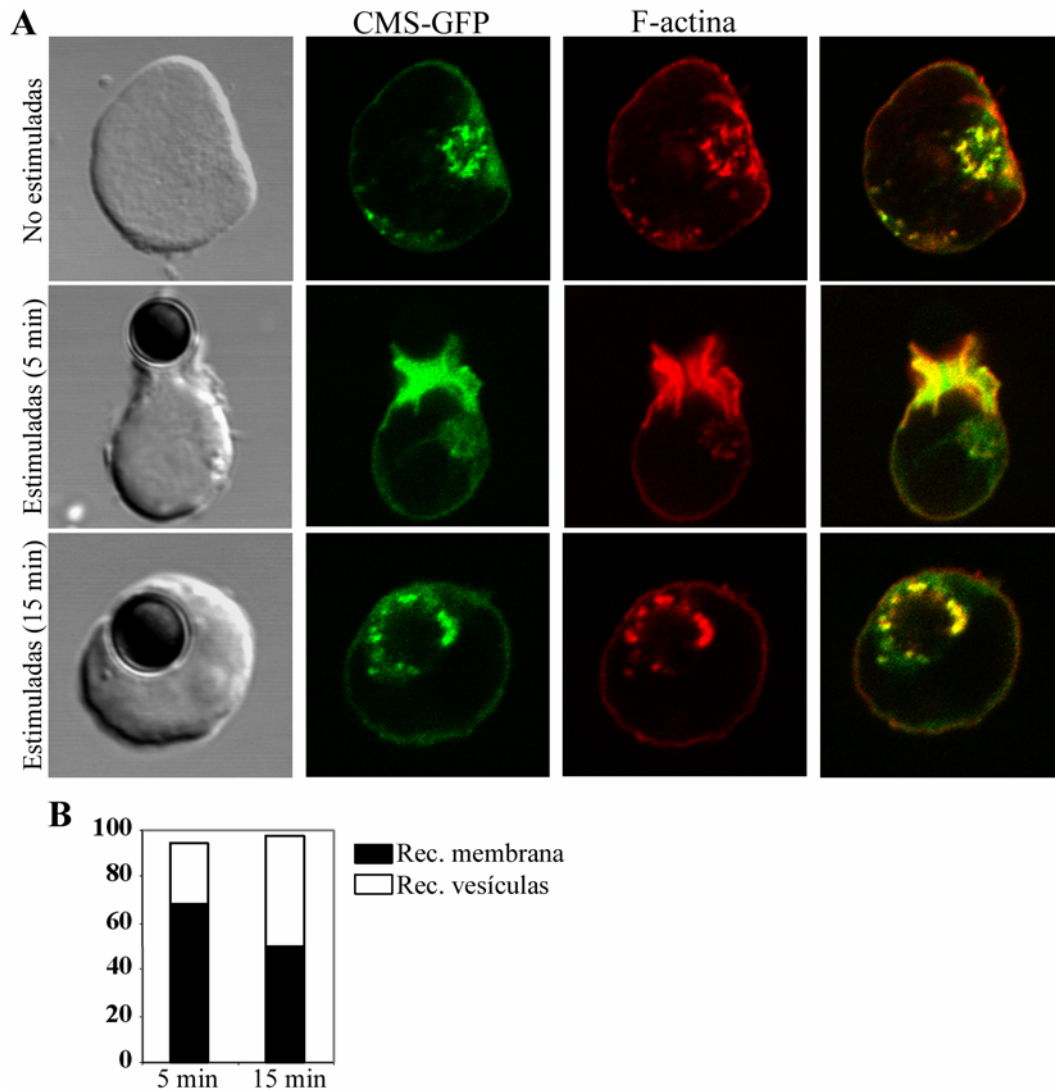


Figura 34. Reclutamiento de CMS y el citoesqueleto de actina a la zona de activación del complejo pre-TCR. **A)** Las células SupT1 transfectadas transitoriamente con CMS-GFP se dejaron sin estimular (primer panel) o se incubaron durante 5 o 15 minutos (segundo y tercer panel, respectivamente) con bolas magnéticas recubiertas de anti-CD3. Tras la activación, las células se fijaron y se marcaron con Faloidina-TRITC para detectar la actina polimerizada (F-actina). Las imágenes corresponden a una única sección de 1 μ m de grosor. **B)** Las células descritas en A) se cuantificaron contando el número de células pegadas a bola con reclutamiento (rec.) de membrana o de vesículas a los dos tiempos (n=100 células). Los datos se expresan en forma de porcentajes. Las imágenes y la cuantificación son representativas de cuatro experimentos independientes.

2.4.3 CMS colocaliza con pT α en la ruta endocítica de las células pre-T humanas

Teniendo en cuenta la distribución intracelular de la proteína CMS en las células SupT1 en condiciones de activación y reposo, con un patrón vesicular que se acumula en la zona de activación del pre-TCR, existe la posibilidad de que estas vesículas endocíticas enriquecidas en CMS participen en la internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR. Para analizar esta posibilidad, realizamos estudios dinámicos de internalización del complejo con anti-pT α (**Figura 19**) en células SupT1 transfectadas con CMS-GFP (**Figura 35**). Este anticuerpo, al contrario de lo que ocurre con los anticuerpos anti-CD3 ϵ , preserva el proceso de internalización del complejo pre-TCR (**Figura 18**), lo que nos permite analizar la dinámica de internalización del pre-TCR en condiciones basales. Como se muestra en la **Figura 35**, tanto en los primeros 15 minutos de marcaje como en la caza posterior, observamos que pT α colocaliza con algunas de las vesículas que contienen CMS, y que toda la marca de pT α que colocaliza con CMS se encuentra en vesículas que no contienen Lamp1. Tras la segunda incubación, se confirma este patrón, indicando que CMS y pT α se separan al llegar a los lisosomas. Por tanto, la interacción entre pT α y CMS parece tener lugar durante el transporte de pT α desde la membrana hasta los lisosomas, es decir, que CMS acompaña a pT α en su transporte intracelular hacia la degradación.

2.5 Relevancia funcional del motivo de unión a CMS en el dominio citoplásmico de pT α

El motivo de unión a CMS dentro de pT α cumple la secuencia consenso de unión de los dominios SH3 de la familia CMS/Cin85. Los datos mostrados en los apartados anteriores indicaban la existencia de una relación funcional entre CMS y pT α . Para determinar la naturaleza de esta relación funcional, hemos usado una construcción de pT α en la que se eliminó el motivo consenso de unión a CMS (pT α Δ Pro2). Para poder estudiar sobre el mismo fondo celular las construcciones pT α wt y pT α Δ Pro2, hemos usado la línea JR3.11 (mutante deficiente en TCR α derivado de la línea T madura humana Jurkat). Esta línea celular expresa de forma natural, retenidos en el retículo endoplásmico, todos los componentes de los complejos TCR y pre-TCR, excepto TCR α y pT α , de manera que la expresión de pT α es capaz de promover la expresión en membrana de un complejo pre-TCR competente. Mediante transducción retroviral, introdujimos las construcciones de pT α , en su versión salvaje (pT α wt) o mutante, carente del motivo de unión a CMS (pT α Δ Pro2). Ambas construcciones llevan un epítipo Flag en el extremo carboxilo terminal que nos permite detectarlas mediante *Western-Blot*.

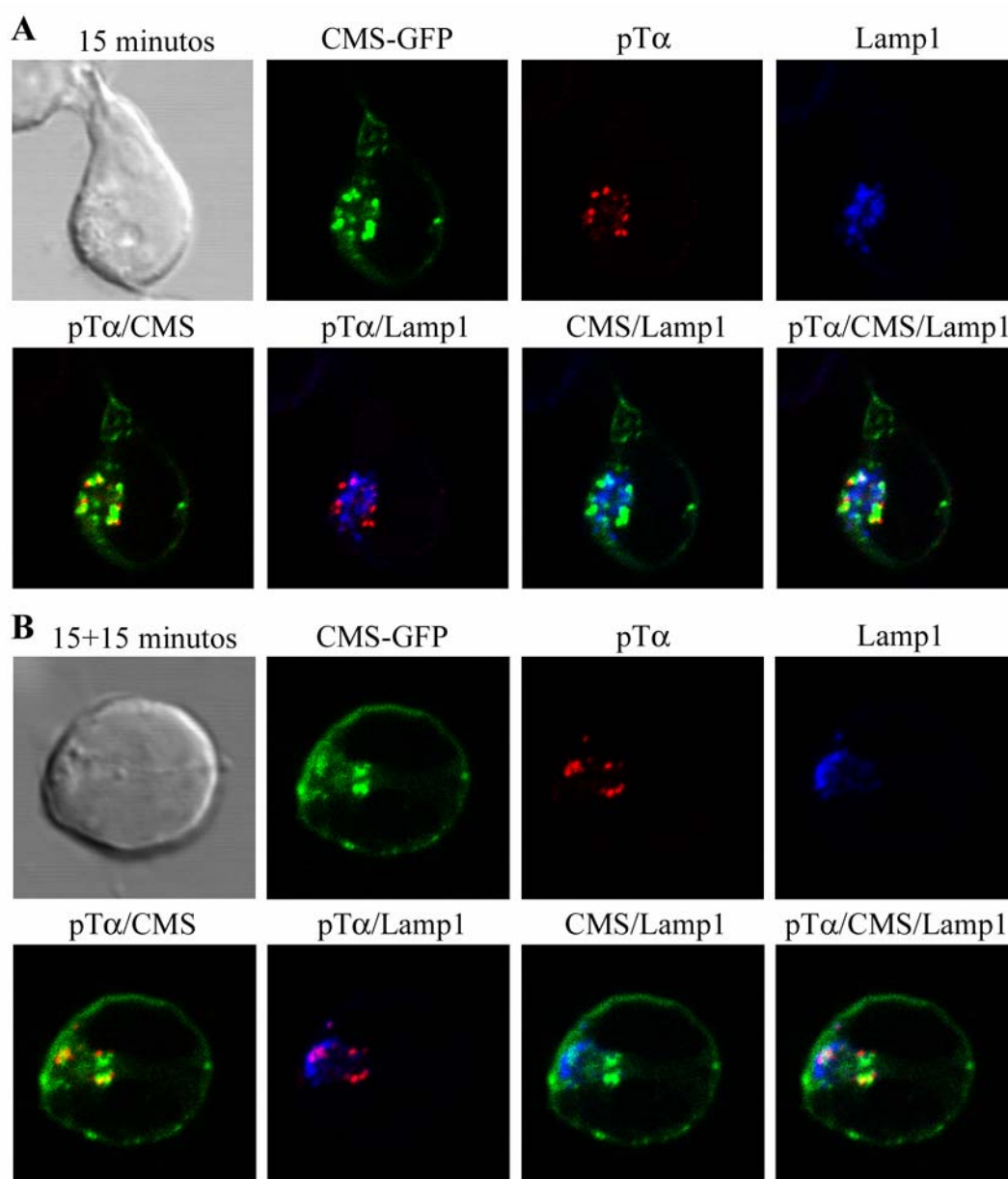


Figura 35. **Endocitosis de la cadena pTα en células SupT1 transfectadas con CMS-GFP.** Las células SupT1 transfectadas transitoriamente con CMS-GFP se marcaron con anti-pTα durante **(A)** 15 minutos o **(B)** 15+15 minutos, como se describe en la Figura 20. La marca de anti-Lamp1 se reveló con anti-IgG1-Alexa647. La marca de anti-pTα se reveló con anti-IgGs de ratón acopladas a Alexa555. Las imágenes corresponden a una única sección de 1μm de grosor, y son representativas de dos experimentos independientes.

En primer lugar, analizamos la capacidad de asociación de ambas construcciones con TCR β mediante inmunoprecipitación y *Western-Blot* con anti-Flag en condiciones no reductoras (**Figura 36A**). Observamos que ambas construcciones son capaces de asociarse a TCR β de manera similar, es decir, que la eliminación del motivo Pro2 no altera la capacidad de asociación de pT α a TCR β . Además, vimos que la expresión exógena de pT α en esta línea induce la expresión de niveles bajos de CD3 en la superficie asociados al complejo pre-TCR. Analizamos mediante citometría de flujo los niveles de expresión de pre-TCR en las células JR-pT α wt o JR-pT α Δ Pro2 con anticuerpos anti-CD3 ϵ y anti-TCR β , y observamos que ambas formas de pT α promueven la expresión de niveles similares de pre-TCR en la membrana (**Figura 36B**).

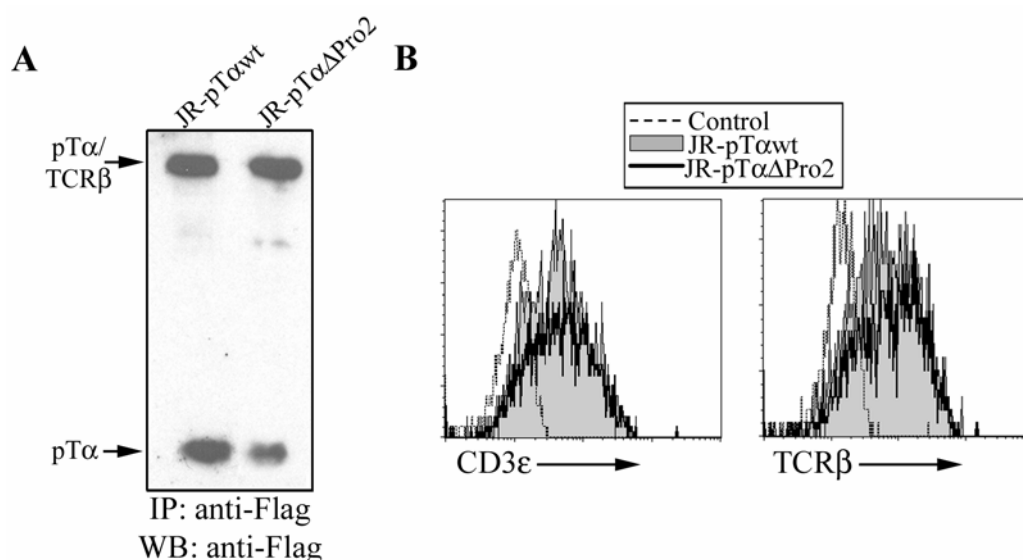


Figura 36. Expresión del complejo pre-TCR en ausencia del dominio de unión a CMS de pT α . Las células JR3.11 se transdujeron retroviralmente con las construcciones pT α wt o pT α Δ Pr2 marcadas con un epítipo Flag. **A)** Las células se lisaron y se inmunoprecipitaron con anti-Flag, y los precipitados se resolvieron mediante *SDS-PAGEs* en condiciones no reductoras y *Western-Blot* con anti-Flag-peroxidasa. **B)** Las células JR-pT α wt (fondo gris) y JR-pT α Δ Pr2 (trazo grueso) se marcaron con anti-CD3 ϵ (UCHT1, panel izquierdo) o con anti-TCR β (JOVI1, panel derecho), revelados con anti-IgGs de ratón acopladas a APC, y se analizaron mediante citometría de flujo. El control negativo (fondo blanco) se determinó con un anticuerpo primario inespecífico seguido de anti-IgGs-APC.

2.5.1 El motivo de unión a CMS en el dominio citoplásmico de pT α no es imprescindible en el proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR

CD2AP, la proteína homóloga a CMS en ratón, se ha implicado en la degradación del complejo TCR $\alpha\beta$ (Lee *et al.*, 2003). Puesto que previamente habíamos

visto que CMS y pT α colocalizan en vesículas de endocitosis en su transporte a los lisosomas (**Figura 35**), quisimos ver si la eliminación del motivo de unión a CMS en la cadena pT α afectaba a la internalización o a la degradación del complejo pre-TCR.

En primer lugar, para analizar el proceso de internalización, determinamos la cinética de desaparición de los complejos de la membrana en las células JR-pT α wt o JR-pT α Δ Pro2 en presencia de brefeldina A. Como se muestra en la **Figura 37A**, la eliminación del motivo Pro2 no altera la entrada de los complejos en la célula, puesto que la cinética de internalización es prácticamente igual en ambos tipos celulares. También analizamos en estas células la internalización de anticuerpos anti-CD3 ϵ o anti-TCR β desde la membrana y determinamos por citometría de flujo la cinética de desaparición de los mismos cuantificando la cantidad de anticuerpo primario que permanece en la membrana a lo largo del tiempo. Estos experimentos (**Figura 37B**), conjuntamente con los mostrados en la **Figura 37A**, muestran una cinética prácticamente idéntica de internalización del complejo pre-TCR salvaje y el complejo pre-TCR que carece del motivo de unión de pT α a CMS.

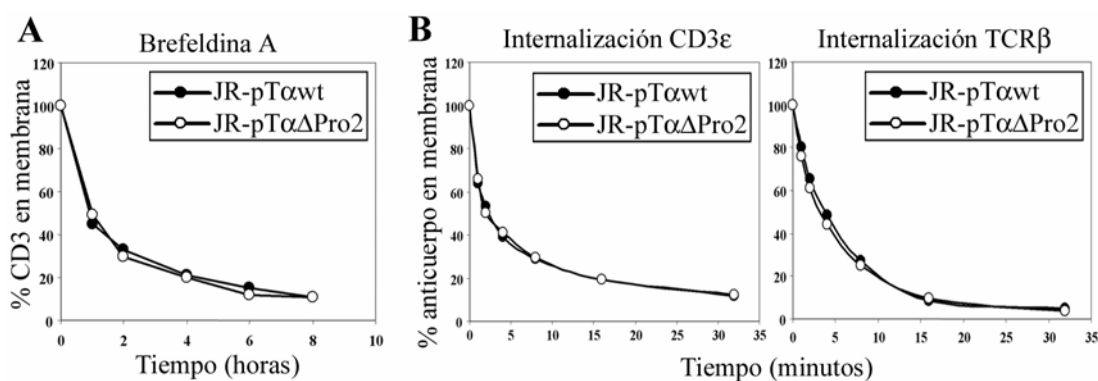


Figura 37. Implicación del motivo de unión a CMS de pT α en la internalización del complejo pre-TCR. **A)** Las células JR-pT α wt y JR-pT α Δ Pr2 se trataron con brefeldina A, y a los tiempos indicados, se analizaron los niveles de expresión de pre-TCR en la membrana con anti-CD3 ϵ -APC. **B)** Las células JR-pT α wt y JR-pT α Δ Pr2 se marcaron con anti-CD3 ϵ (UCHT1, panel izquierdo) o con anti-TCR β (JOV11, panel derecho) a 4°C, y después se incubaron a distintos tiempos a 37°C para promover la internalización de los anticuerpos. La cantidad de anticuerpo no internalizado presente en la membrana se determinó mediante citometría de flujo con anti-IgGs-APC. En los dos apartados, se muestra un experimento representativo de tres.

En segundo lugar, quisimos analizar el proceso de degradación del pre-TCR en las células JR-pT α wt o pT α Δ Pro2. Por un lado, analizamos en ambos tipos celulares la desaparición de la proteína pT α total en forma monomérica y de los heterodímeros pT α /TCR β mediante *Western-Blot* en presencia de cicloheximida (**Figura 38A**) y, por otro lado, determinamos la cinética de desaparición del complejo pre-TCR de la membrana por citometría de flujo en presencia de cicloheximida (**Figura 38B**). En la

Figura 38A se observa que el destino intracelular tanto de la construcción pT α wt como del mutante pT α Δ Pro2 es la degradación, tanto en su forma monomérica como el dímero formado con TCR β , y como se muestra en las densitometrías en la parte inferior de la **Figura 38A**, la velocidad de degradación es muy similar en las dos construcciones. En la **Figura 38B** se observa que la desaparición de la membrana de uno u otro complejo en presencia de cicloheximida, reflejo del proceso de degradación que ocurre intracelularmente, presentan cinéticas similares.

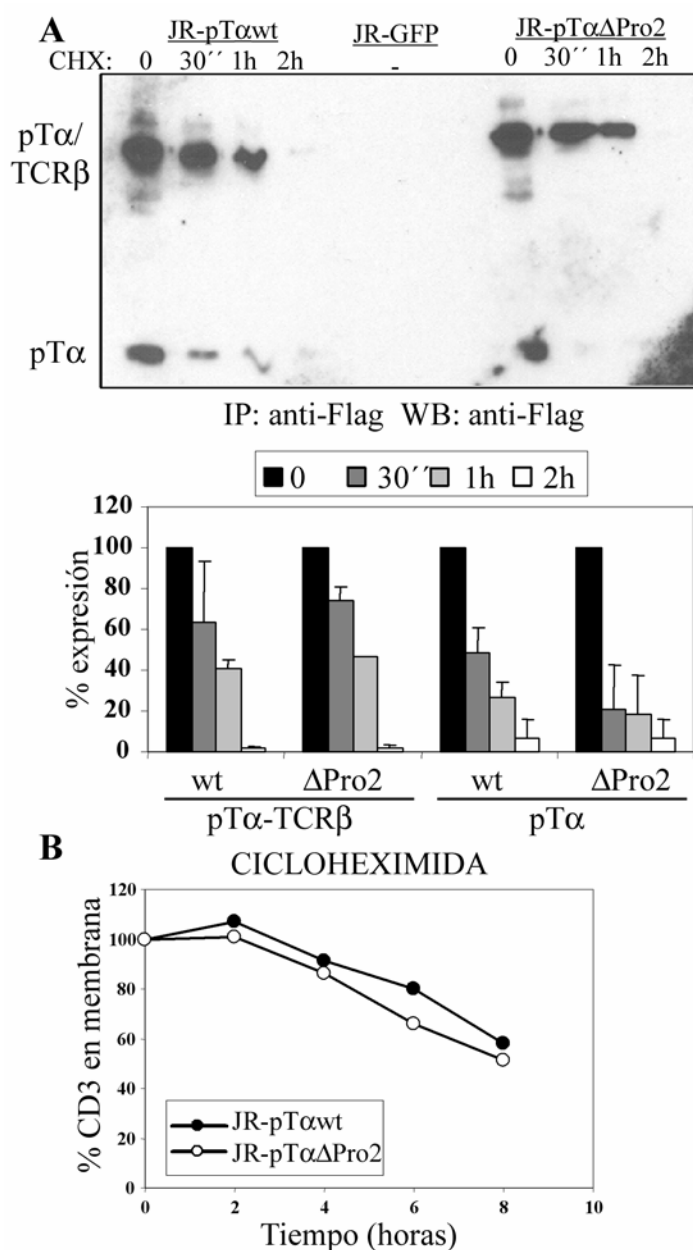


Figura 38. Implicación del motivo de unión a CMS de pT α en la degradación del complejo pre-TCR. Las células JR-pT α wt y JR-pT α Δ Pro2 se trataron con cicloheximida, a los tiempos indicados en la figura, **A)** se lisaron y se inmunoprecipitaron con anti-Flag. Los precipitados se resolvieron mediante *SDS-PAGEs* en condiciones no reductoras y *Western-Blot* con anti-Flag-peroxidasa. Las bandas se cuantificaron por densitometría. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos distintos \pm SD o **B)** se analizaron los niveles de expresión de pre-TCR en la membrana con anti-CD3 ϵ -APC. Se muestra un experimento representativo de tres.

El conjunto de datos mostrados en las **Figuras 37 y 38** indica que, al menos en este sistema celular, el motivo de unión a CMS de la cadena pT α no es indispensable para el proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR, aunque no podemos excluir la posibilidad de que los abordajes experimentales

utilizados no sean lo suficientemente sensibles como para determinar la participación del motivo Pro2 en la degradación del pre-TCR en estos procesos.

2.5.2 El motivo de unión a CMS en el dominio citoplásmico de pTα está implicado en la función del complejo pre-TCR

Los adaptadores CMS/Cin85 se han implicado en el reclutamiento de numerosas proteínas importantes en la señalización mediada por distintos receptores (TCR, EGFR). De hecho, se ha demostrado su interacción en otros sistemas con varias proteínas intracelulares importantes en la señalización del pre-TCR y del TCR, como c-Cbl, Src-quinasas, Grb2 o la subunidad reguladora p85 de la PI3-quinasa (Dikic, 2002). Por ello, quisimos determinar si el motivo de unión a CMS en pTα tenía algún papel en la señalización del complejo pre-TCR. Se sabe que la señalización a través del complejo pre-TCR induce la movilización de calcio, y que ésta es importante para su función durante el desarrollo de los linfocitos T. Teniendo en cuenta estos datos, analizamos la movilización de calcio inducida por anticuerpos anti-CD3ε en las células JR-pTαwt y JR-pTαΔPro2, y observamos que el mutante de pTα carente del motivo de unión a CMS presentaba una deficiencia clara en la movilización de calcio con respecto a las células pTαwt (**Figura 39**).

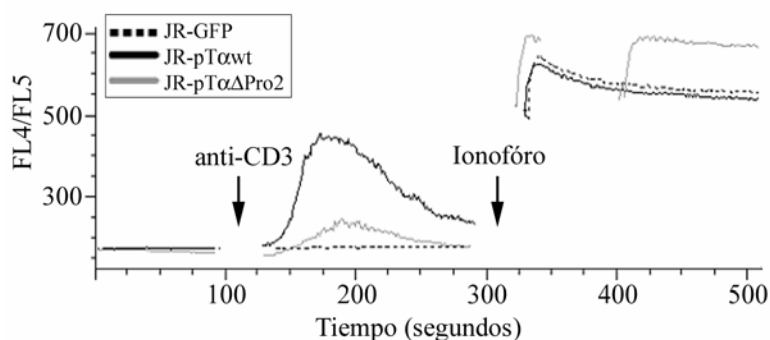


Figura 39. Movilización de calcio inducida por anti-CD3ε en las células JR-pTαwt y JR-pTαΔPro2. Las células se incubaron con Indo-1AM, y se analizó la movilización de calcio ante una activación anti-CD3ε por citometría de flujo, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de cinco independientes.

El incremento en la concentración intracelular de iones Ca^{2+} es importante para la activación de numerosas proteínas intracelulares, entre ellas, los factores de transcripción NFAT y NF-κB, necesarios para la función del complejo pre-TCR (Aifantis *et al.*, 2001), por lo que decidimos analizar el efecto de la mutación pTαΔPro2 sobre la actividad transcripcional de ambos factores de transcripción. Para analizar la actividad transcripcional de NFAT en el mutante de pTα, usamos un vector reportero

que expresa la proteína luciferasa bajo un promotor de respuesta a NFAT. Este vector se transfectó en las células JR-pT α wt o -pT α Δ Pro2, y se analizaron los niveles de actividad transcripcional de NFAT tras la activación con anti-pT α o anti-CD3 ϵ . La inducción de la expresión de la luciferasa en las distintas condiciones se determinó como se explica en Materiales y Métodos. En la **Figura 40** se muestra que, coincidiendo con la deficiente movilización de calcio, las células JR-pT α Δ Pro2 presentan una menor actividad transcripcional de NFAT.

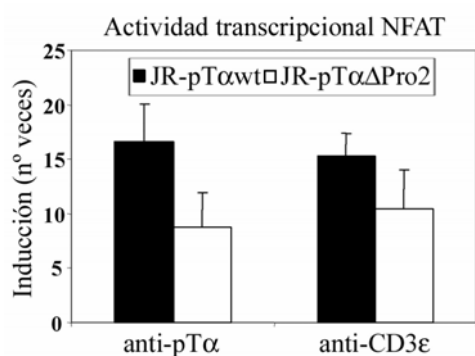


Figura 40. Actividad transcripcional de NFAT inducida por anti-pT α y anti-CD3 en las células JR-pT α wt y JR-pT α Δ Pr2. Las células se transfectaron con un vector reportero para la actividad de NFAT y se activaron con anti-pT α o anti-CD3 pegado a placa. La inducción de la actividad transcripcional de NFAT se expresa en términos relativos respecto a los valores obtenidos para las células no estimuladas con anticuerpo. Los datos muestran la media \pm SD de la inducción de tres experimentos.

Se realizaron experimentos similares para determinar la actividad transcripcional de NF- κ B en estas células, usando un vector reportero de luciferasa bajo un promotor de respuesta a NF- κ B. Observamos una alta la actividad basal de NF κ B en las células JR-pT α wt, que no se incrementaba tras la activación con anticuerpos anti-pre-TCR (datos no mostrados), lo que sugiere que NF- κ B está activado de forma constitutiva en estas células, probablemente como consecuencia de la activación constitutiva del complejo pre-TCR. Sin embargo, observamos que los niveles basales de actividad NF- κ B eran significativamente menores en las células JR-pT α Δ Pro2 con respecto a las células pT α wt (**Figura 41**), lo que es compatible con una señalización defectuosa del complejo en los mutantes. En conjunto, estos datos demuestran que el motivo de unión a CMS en pT α es necesario para la señalización a través del complejo pre-TCR, e indican que la unión de CMS a pT α tendría un papel activador en esta señalización.

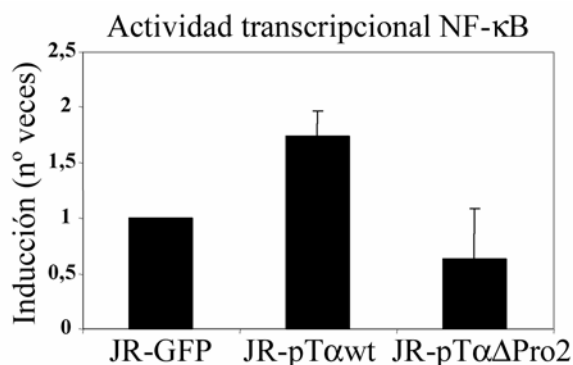


Figura 41. **Actividad transcripcional basal de NF-κB en las células JR-pTαwt y JR-pTαΔPr2.** Las células se transfectaron con un vector reportero para la actividad de NF-κB. La actividad transcripcional basal de NF-κB se expresa en términos relativos respecto a los valores obtenidos para las células control JR-GFP que no expresan el pre-TCR. Los datos muestran la media \pm SD de tres experimentos.

Finalmente, para analizar de manera directa la posible implicación de la proteína CMS en la señalización dependiente de calcio a través del complejo pre-TCR, analizamos la actividad transcripcional de NFAT inducida por el pre-TCR en condiciones de sobreexpresión de CMS o de dos construcciones que codifican los dominios SH3 o la región C-terminal de CMS (CMS-SH3ABC y CMS-Ct, esquema en **Figura 42A**). La construcción CMS-SH3ABC portaría los motivos de unión a pTα (**Figura 27**), pero sería incapaz de interaccionar con proteínas a las que se une a través de los motivos ricos en prolina o de formar homodímeros, puesto que carece del dominio *coiled-coil*, mientras que la construcción CMS-Ct sería incapaz de interaccionar con pTα, puesto que carece de los dominios SH3. Ambas construcciones podrían actuar bien como dominantes negativos o como formas constitutivamente activas de la función de CMS. Las células JR-pTαwt se cotransfectaron con las distintas construcciones de CMS o el vector vacío y los vectores reporteros, y se analizó la actividad transcripcional de NFAT tras la activación con anti-pTα (**Figura 42B**). Los datos obtenidos muestran que la construcción CMS-SH3ABC aumenta la actividad transcripcional de NFAT, lo que indica un papel activador de CMS sobre la señalización del pre-TCR. Este efecto implicaría algún tipo de regulación negativa ejercida por la parte C-terminal de CMS, ausente en la construcción CMS-SH3ABC. De hecho, la sobreexpresión de la parte C-terminal de CMS (CMS-Ct), muestra una ligera inhibición de la actividad transcripcional de NFAT. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína CMS completa inhibe de forma dramática la actividad de NFAT. Existe la posibilidad de que la sobreexpresión de CMS esté actuando como dominante negativo sobre su propia función, al secuestrar efectores celulares necesarios para la propagación de la señal del pre-TCR, aunque también es posible que la función de CMS dentro de la cascada de señalización del pre-TCR sea más compleja que activar o inhibir, y que CMS tenga un papel dual.

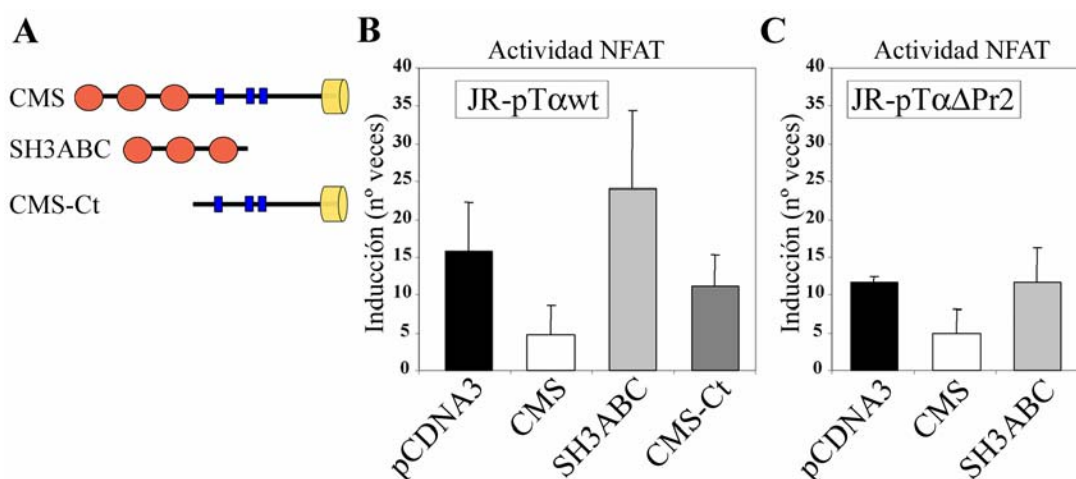


Figura 42. Efecto de la sobreexpresión de CMS sobre la actividad transcripcional de NFAT inducida por el pre-TCR. Las células JR-pTαwt (**B**) y JR-pTαΔPr2 (**C**) se cotransfectaron con las construcciones de CMS esquematizadas en (**A**) o el vector vacío, y con un vector reportero para la actividad de NFAT y se activaron con un anticuerpo anti-pTα. La actividad transcripcional de NFAT se expresa en términos relativos respecto a los valores obtenidos para las células no estimuladas. Los datos representan la media \pm SD de inducción de tres experimentos.

Nuestros datos permiten concluir que CMS es un adaptador intracelular del complejo pre-TCR, aunque existe la posibilidad de que la función de CMS sobre la señalización del complejo no dependa de la asociación directa a la cadena pTα, sino del reclutamiento de CMS al pre-TCR a través de otros adaptadores. Para discriminar entre estas dos posibilidades, decidimos analizar la actividad transcripcional de NFAT en condiciones de sobreexpresión de CMS, CMS-SH3ABC y CMS-Ct en las células JR-pTαΔPro2, en las que la interacción directa entre pTα y CMS no podría tener lugar (**Figura 28**). Los resultados de estos experimentos muestran que, en contra de lo que ocurre en las células JR-pTαwt, la sobreexpresión de la construcción CMS-SH3ABC no induce un incremento de la actividad de NFAT en las células JR-pTαΔPro2 (**Figura 42C**), lo que indica que el papel activador de CMS sobre la señalización a través del pre-TCR es específico de su interacción con la cadena pTα. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la sobreexpresión de la proteína completa ocurre también en las células JR-pTαΔPro2, por lo que este efecto no es dependiente de la interacción de pTα y CMS. En conjunto, estos datos corroboran la funcionalidad de CMS como adaptador intracelular de la cadena pTα, y sugieren un papel complejo de CMS sobre la señalización a través del pre-TCR, con una función activadora específica de la interacción directa entre pTα y CMS, y una función inhibitoria de la señalización, se ejercería por mecanismos independientes de la interacción de CMS con el motivo Pro2 de pTα.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR

El complejo pre-TCR se expresa a niveles muy bajos en la membrana celular y en una estrecha ventana temporal durante el desarrollo de los linfocitos T, lo que indica que su expresión está sujeta a mecanismos de regulación específicos. Los bajos niveles de expresión en la superficie son una propiedad específica del complejo pre-TCR, no dependiente del estadio celular inmaduro en el que se expresa, puesto que un complejo $\text{TCR}\alpha\beta$ convencional puede expresarse a niveles altos en una línea pre-T (**Figura 9**), lo que además indica que ninguno de los componentes comunes del pre-TCR y el TCR se encuentra en condiciones limitantes que pudiesen explicar los bajos niveles de expresión. Por otro lado el complejo pre-TCR, incluso en un contexto de sobreexpresión de la cadena $\text{pT}\alpha$ una línea T madura, se expresa igualmente a niveles bajos (**Figura 36B**) (Carrasco *et al.*, 2001). Mientras que la expresión transitoria del pre-TCR en un estadio intratímico concreto está regulada a nivel transcripcional, los bajos niveles de expresión del pre-TCR en la superficie celular indica la existencia de mecanismos de regulación adicionales, dirigidos probablemente al control de un complejo potencialmente oncogénico (Bellavia *et al.*, 2002; Talora *et al.*, 2003) cuya señalización es autónoma, independiente de la interacción con un ligando (Aifantis *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 1998).

Datos generados en nuestro laboratorio habían sugerido que la cadena $\text{pT}\alpha$ podía controlar los niveles de expresión en la membrana mediante al menos dos mecanismos postranscripcionales distintos: la retención en el retículo endoplásmico (Carrasco *et al.*, 2001) y el secuestro de componentes del pre-TCR en el retículo por parte de la isoforma $\text{pT}\alpha^b$ (Ramiro *et al.*, 2001). Los resultados expuestos en la primera parte de este trabajo de Tesis Doctoral demuestran la existencia de un tercer mecanismo de regulación de la expresión en membrana del complejo pre-TCR, la internalización y la degradación constitutiva, que también es dependiente del dominio intracelular de la cadena $\text{pT}\alpha$. Los datos obtenidos respecto a la dinámica de expresión del complejo pre-TCR en la membrana muestran que este receptor se internaliza de forma continua, igual que ocurre en un $\text{TCR}\alpha\beta$ no activado, aunque considerablemente más deprisa. El complejo TCR no estimulado, una vez internalizado, se recicla a la membrana celular, manteniéndose niveles de expresión estables incluso en ausencia de síntesis *de novo* (Liu *et al.*, 2000). Sin embargo, el complejo pre-TCR presenta una baja tasa de reciclaje y es fuertemente dependiente del aporte de proteínas de nueva síntesis para mantener niveles estables en la membrana. Los datos que presentamos en este estudio indican que, a diferencia del TCR, en ausencia de estímulo exógeno los complejos pre-TCR internalizados son

mayoritariamente derivados hacia la vía degradativa. El primer indicio acerca de la degradación constitutiva del complejo pre-TCR fue la localización intracelular de una proteína quimérica TCR ζ -GFP en los lisosomas en células pre-T humanas. En una célula T madura no estimulada, una construcción similar se localiza mayoritariamente en la membrana y en compartimentos intracelulares que colocalizan con transferrina y con marcadores del cis-Golgi, es decir, en el compartimento de los endosomas de reciclaje (Blanchard *et al.*, 2002). Sin embargo, nuestros datos en la línea pre-T humana SupT1 indican que más de la mitad de la cadena TCR ζ se encuentra en los lisosomas. Al bloquear la síntesis de proteínas observamos que paralelamente a la pérdida de la expresión en membrana del complejo pre-TCR, también desaparecen la proteína quimérica TCR ζ -GFP, así como las cadenas TCR β y TCR ζ endógenas, indicando claramente que estas proteínas se degradan tras la internalización. Una aproximación experimental similar en células T maduras indican que, en ausencia de estímulo, la inhibición de la síntesis de proteínas no altera el contenido total de ninguno de los componentes del complejo TCR-CD3 (Valitutti *et al.*, 1997), de manera que la degradación constitutiva de TCR β y TCR ζ que observamos en la línea SupT1 sería una propiedad específica del complejo pre-TCR. Este comportamiento es similar al que se observa para los componentes de un TCR maduro activo (Valitutti *et al.*, 1997).

En el caso de las células T maduras, la mayor parte de las cadenas que componen el TCR se encuentran formando parte del complejo completo que se expresa en la membrana, mientras que en el caso del pre-TCR, sólo una pequeña fracción de cada componente forma parte del complejo que se expresa en la membrana. Una cantidad considerable de los componentes del pre-TCR se encontrarían acumulados en el retículo endoplásmico (Carrasco *et al.*, 2001), lo que dificulta los estudios de degradación del complejo ya que existe la posibilidad de que la degradación que vemos con respecto a la proteína total no esté reflejando el destino intracelular del complejo que se expresa en la membrana. Para identificar claramente el destino intracelular del complejo que se expresa en la membrana, parte de nuestro estudio se ha centrado en el análisis de las cadenas TCR ζ asociadas específicamente al complejo pre-TCR, y del heterodímero pT α /TCR β que se expresa en la membrana mediante marcajes con biotina de la superficie celular (**Figura 15** y (Carrasco *et al.*, 2003)). Estos estudios muestran que el destino intracelular, al menos para estos componentes del pre-TCR, es la degradación, principalmente en los lisosomas. El sistema ubiquitina-proteasoma parece tener también una función en este proceso, puesto que también se observa un bloqueo de la degradación en presencia de inhibidores del proteasoma. Existe la posibilidad de que el papel del proteasoma no sea sobre degradación directa de las cadenas que forman el pre-TCR, sino sobre el transporte de los complejos internalizados. La inhibición de la actividad del proteasoma tiene como consecuencia la acumulación de proteínas

ubiquitinadas, disminuyendo el contenido de ubiquitina libre en las células. Este efecto secundario altera de forma inespecífica el transporte intracelular, puesto que gran parte de la maquinaria encargada de la internalización y posterior transporte intracelular de proteínas de membrana es dependiente de ubiquitinación (Longva *et al.*, 2002; Rocca *et al.*, 2001).

El proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR está conservado entre los complejos de humano y ratón, apoyando su importancia dentro de la regulación de la expresión en membrana del pre-TCR en ambas especies (Panigada *et al.*, 2002). Además, los datos obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral determinan que la alta tasa de degradación y bajo reciclaje son propiedades que residen en el dominio citoplásmico de la cadena pT α , puesto que su presencia en una proteína quimérica TCR α -pT α es suficiente para inducir este tipo de comportamiento en un complejo TCR $\alpha\beta$ no estimulado, independientemente del fondo celular. Estos datos demuestran que el dominio citoplásmico de la cadena pT α , en contra de los primeros datos generados en ratón (Fehling *et al.*, 1997; Gibbons *et al.*, 2001), presenta propiedades específicas, no compartidas con TCR α . En el modelo de ratón no se ha analizado la implicación directa del tallo intracitoplásmico de pT α en este proceso (Panigada *et al.*, 2002).

Nuestros datos indican que el complejo pre-TCR en condiciones de no estimulación se comporta de manera similar al TCR tras la estimulación antigénica, puesto que los complejos, una vez internalizados, son derivados intracelularmente hacia su degradación (Liu *et al.*, 2000; Valitutti *et al.*, 1997). En el caso de la regulación negativa que sufre el TCR tras la estimulación, se ha propuesto que serviría por un lado para favorecer la interacción del receptor con proteínas señalizadoras intracelulares, no accesibles desde la membrana y por otro lado sería responsable de la terminación de la señal. Apoyando esta última función, el bloqueo de la modulación negativa del TCR conduce a una señalización exacerbada (Andre *et al.*, 1997; Naramura *et al.*, 2002). En el caso del pre-TCR, la sobreexpresión de pT α durante el desarrollo T produce un aumento de la proliferación de la población DN3, indicando la importancia dentro del proceso de diferenciación de los linfocitos T de la terminación de la señal del pre-TCR (Lacorazza *et al.*, 2001). Además, la señalización a través del pre-TCR se ha implicado, junto con otros factores, en la generación de leucemias (Talora *et al.*, 2003; Talora *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta estos datos, proponemos que la internalización y degradación constitutiva del pre-TCR sería el mecanismo responsable de la terminación de la señal, muy importante dada su capacidad de señalización autónoma, aunque la relevancia funcional de este proceso en un sistema *in vivo* aún no se ha determinado. Estos datos sugieren que tanto la capacidad de iniciar y transmitir la señalización del

pre-TCR como la de terminar esa señal residirían en un único componente, la cadena pT α (Aifantis *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2003; Yamasaki *et al.*, 2006).

El análisis de la internalización y degradación de la cadena pT α por microscopía confocal muestra que la velocidad de degradación del complejo es mucho más rápida de lo que permitían suponer los datos obtenidos mediante abordajes bioquímicos. En estos estudios, se había visto que los complejos expresados en la membrana tardarían aproximadamente dos horas en degradarse, tanto en ratón como en humanos (Carrasco *et al.*, 2003; Panigada *et al.*, 2002), mientras que nuestros datos muestran que en 30 minutos, prácticamente la totalidad del complejo se transporta desde la membrana hasta los lisosomas, donde se degrada. Además, este abordaje nos ha permitido analizar la internalización y degradación del complejo *in vivo* utilizando timocitos humanos aislados *ex vivo*. Los abordajes bioquímicos no son fáciles en este tipo de células, puesto que los niveles de expresión de pre-TCR en la superficie celular son aún más bajos que en la línea celular SupT1, y por tanto, difíciles de detectar mediante marcajes con biotina. La generación en nuestro laboratorio de un anticuerpo monoclonal específico para la cadena pT α ha sido esencial para nuestros estudios microscopía confocal, y nos ha permitido ver que el proceso de internalización y desvío intracelular del complejo hacia la degradación en los lisosomas ocurre también en células pre-T *in vivo*, e incluso a mayor velocidad que en la línea pre-T SupT1, puesto que tan pronto como en 15 minutos, el 60% de los complejos en la membrana han alcanzado los lisosomas (**Figura 21**). Datos publicados con respecto al TCR con un abordaje experimental similar muestran que tras 4 horas de estimulación, el 50% del TCR marcado en la membrana se detecta en los lisosomas, por lo que el pre-TCR se degrada mucho más rápido que el TCR (Torres *et al.*, 2003).

Mecanismos moleculares que participan en la internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR

En el caso del TCR, la internalización constitutiva del complejo depende de la fosforilación en un residuo de serina en el tallo intracitoplásmico de la cadena CD3 γ por la proteína quinasa C (PKC), que expone una secuencia de internalización (motivo dileucina) presente en dicha cadena (Alcover y Alarcon, 2000; Dietrich *et al.*, 1996). Por tanto, la activación de PKC con ésteres de forbol como el PMA aumenta la internalización del complejo TCR, induciéndose la pérdida del complejo de la membrana. Sin embargo, tratamientos similares en células pre-T humanas no inducen la pérdida del complejo pre-TCR (Carrasco *et al.*, 2003), indicando que la internalización constitutiva del pre-TCR no es dependiente de la fosforilación por PKC de CD3 γ . Aunque la internalización constitutiva del TCR es dependiente de CD3 γ y PKC, la

degradación del complejo TCR en presencia de estímulos activadores es independiente de dicho mecanismo (Niedergang *et al.*, 1997), lo que refuerza la idea de que el pre-TCR se comporta en ausencia de ligando de manera análoga al TCR activado.

Respecto a los mecanismos moleculares que controlan el proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR, en este estudio hemos analizado el papel de la familia de proteínas Src-quinasas y el citoesqueleto de actina, cuya participación en la internalización y degradación de otros receptores de membrana, entre ellos, el TCR, está ampliamente descrito en la literatura (Alcover y Alarcon, 2000; Qualmann *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos mediante el uso de inhibidores específicos de la actividad Src-quinasa y de la polimerización de actina nos han permitido establecer una hipótesis sobre el mecanismo de degradación constitutiva del complejo pre-TCR que se encuentra resumido en la **Figura 43**. En una situación normal, en ausencia de estímulo, el complejo pre-TCR se internalizaría de forma rápida y continua. Desde el compartimento de los endosomas tempranos, los complejos serían transportados mayoritariamente hacia los lisosomas, existiendo una baja proporción de complejos que serían reciclados de nuevo a la membrana. Por tanto, la expresión de niveles estables de pre-TCR en la superficie celular depende mayoritariamente del aporte continuo de complejos de nueva síntesis (**Figura 43A**).

La inhibición de la actividad Src-quinasa muestra un retraso en la internalización del complejo desde la membrana, así como un aumento en la tasa de reciclaje, mientras que no altera el transporte de los complejos a los lisosomas. Por tanto, la actividad Src-quinasa estaría actuando sobre el control del equilibrio entre la internalización y el reciclaje, pero no sería necesaria en la selección de los complejos para su degradación (**Figura 43B**). Sin embargo, los efectos observados en presencia del inhibidor de Src-quinasas no son muy pronunciados, lo que implica mecanismos adicionales que controlarían la entrada del complejo en la célula y su selección hacia reciclaje o degradación. En el caso del pre-TCR de ratón, el inhibidor de Src-quinasas PP2 provoca una inhibición parcial en la degradación, así como un aumento en los niveles de expresión del pre-TCR durante el desarrollo de los linfocitos T (Panigada *et al.*, 2002). La aproximación bioquímica usada en los estudios de ratón es compatible con nuestra hipótesis de que las Src-quinasas no participan directamente en la selección de los complejos para su degradación, pero sí tendrían un papel en el control del equilibrio entre internalización y reciclaje. Con respecto al complejo TCR, existe cierto grado de controversia sobre el papel de las Src-quinasas en la degradación del TCR activado. Mientras que algunos autores proponen que las Src-quinasas (concretamente la proteína Lck) participan en la degradación del TCR tras su estimulación (D'Oro *et al.*, 1997; Martin y Bevan, 1998), otros autores no observan efecto con inhibidores de la Src-quinasas (Salio *et al.*, 1997). La diferencia en los datos del TCR puede depender de los

distintos estímulos o concentraciones de los mismos usadas para inducir la degradación (anticuerpos, superantígenos solubles o péptidos presentados en el contexto del MHC) (Alcover y Alarcon, 2000). Esta controversia sugiere que, al igual que en el caso del pre-TCR, existen mecanismos dependientes así como independientes de Src-quinasas que participan en la regulación negativa del complejo TCR.

El citoesqueleto de actina puede participar en la internalización de complejos desde la membrana a distintos niveles: promoviendo la invaginación de la membrana para formar vesículas de endocitosis, participando en la fisión de la membrana que libera las vesículas al citosol y en el movimiento de dichas vesículas en el citosol y entre los distintos compartimentos endocíticos (Qualmann *et al.*, 2000). Los datos obtenidos respecto a la dinámica del pre-TCR muestran que la inhibición de la polimerización de actina ejerce un pequeño retraso en la internalización de los complejos desde la membrana. El efecto más llamativo de la ausencia de un citoesqueleto de actina activo es sin duda sobre el transporte del complejo desde los endosomas tempranos hacia los lisosomas, que es totalmente dependiente de la presencia de un citoesqueleto activo (**Figura 43C**). El transporte de la cadena pT α internalizada queda bloqueado en los endosomas tempranos al inhibir la polimerización de actina, siendo incapaz de progresar hacia los lisosomas. Para el complejo pre-TCR de ratón, también se ha visto que la presencia de un citoesqueleto de actina activo es fundamental para la degradación del complejo pre-TCR (Panigada *et al.*, 2002).

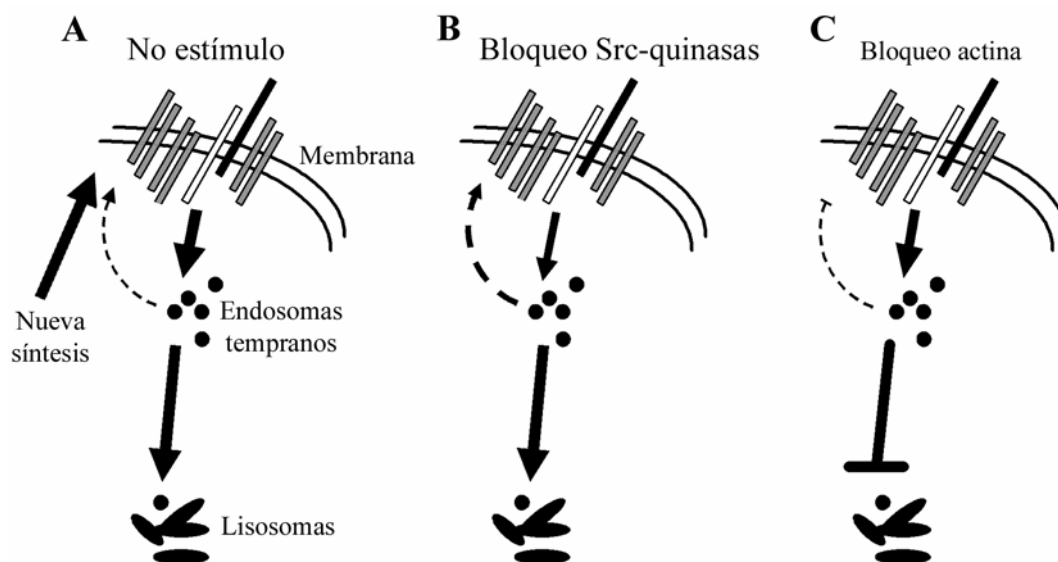


Figura 43. Modelo del proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR. Función de las proteínas Src-quinasas y el citoesqueleto de actina. A) Proceso normal. B) Proceso en ausencia de la actividad Src-quinasa. C) Proceso en ausencia de polimerización de actina.

Ligandos intracelulares de la cadena pT α humana

Desde el clonaje de la cadena pT α la presencia de un largo dominio citoplásmico tanto en ratón como en humanos, muy distinto a las cadenas TCR α o TCR β , sugería un papel activo de esta proteína dentro de la señalización a través del complejo pre-TCR (Del Porto *et al.*, 1995; Hayday *et al.*, 1999; Ramiro *et al.*, 1996). Además, dentro del tallo citoplásmico de pT α en humano y ratón existen sitios potenciales para la fosforilación a través de PKC y para la unión de proteínas con dominios SH3 (**Figura 3**). Sin embargo, los estudios iniciales para determinar su función en ratón mostraron que ni el dominio extracelular ni el dominio intracitoplásmico de pT α eran necesarios para ejercer su función (Fehling *et al.*, 1997; Gibbons *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 1998). Estos datos presentaban a la cadena pT α como un mero componente estructural, necesario únicamente para promover la expresión en membrana del complejo pre-TCR. Este punto de vista estaba apoyado por el hecho de que los dominios citoplásmico de las cadenas pT α de humano y ratón no presentan homología entre sí (Del Porto *et al.*, 1995; Ramiro *et al.*, 1996), y porque determinados estudios sugerían que la cadena TCR α podía sustituir en su función a pT α (Haks *et al.*, 2003). Sin embargo, los datos iniciales de nuestro laboratorio procedentes de estudios en humanos demostraron un papel específico de la cadena pT α en la retención del complejo en el retículo endoplásmico y, por tanto, en el control de los niveles de expresión de los complejos de nueva síntesis (Carrasco *et al.*, 2001). Además, los estudios presentados en esta memoria utilizando proteínas quiméricas TCR α -pT α aportan resultados claros sobre la implicación del dominio intracelular de pT α en el proceso de endocitosis y degradación constitutiva del complejo, por lo que nuestra conclusión es que este dominio confiere características exclusivas al complejo pre-TCR, regulando sus niveles de expresión en la superficie. Datos más recientes en ratón en los que se han analizado ratones con transgenes de pT α deficientes en el dominio intracelular que se expresan a niveles transcripcionales similares a la cadena endógena han corroborado la importancia del dominio intracitoplásmico de pT α dentro del desarrollo de los linfocitos T también en ratón (Aifantis *et al.*, 2002), en contra de los primeros datos obtenidos en ratón en los que probablemente la sobreexpresión de los transgenes estaba enmascarando su función. Concretamente, se ha visto que la región C-terminal del tallo de la cadena pT α , que incluye dos motivos ricos en prolina de la cadena pT α , es necesaria para la función del pre-TCR durante el proceso de selección β . Estos datos refuerzan la importancia de la identificación de proteínas intracelulares adaptadoras que puedan interaccionar con los motivos ricos en prolina de la cadena pT α y que den cuenta de la función específica de esta cadena en la señalización a través del pre-TCR.

A pesar de la baja homología de secuencia entre los dominios intracelulares de las cadenas pT α de humano y ratón (**Figura 3**), existe un motivo rico en prolinas (Pro3) parcialmente conservado, presente en una única copia en la cadena humana y duplicado en la cadena de ratón, que además es similar a un motivo presente en la región intracelular de la molécula CD2. Este motivo podría participar en la señalización del pre-TCR (Aifantis *et al.*, 2002; Hayday *et al.*, 1999). En este estudio hemos identificado varias secuencias ricas en prolinas adicionales en la cadena pT α humana. En la cadena pT α humana, aparte del motivo con homología a CD2, existe una secuencia de poli-prolinas-arginina SPRPQPR (Pro2, **Figura 25A**) que cumple la secuencia atípica para la unión de los dominios SH3 de la familia de adaptadores Cin85/CMS PX(P/A)XXR o PXXXPR (Kowanetz *et al.*, 2003; Kurakin *et al.*, 2003). Aunque actualmente no hay muchos datos disponibles acerca del papel de estas proteínas dentro del sistema inmune, su participación en la internalización, señalización y degradación de receptores de membrana como el EGFR, y la presencia de un motivo de unión en la cadena pT α , señalan a estas proteínas como excelentes candidatos para el control de la señalización del complejo pre-TCR. Además, aunque estas proteínas se expresan de forma ubicua, se han detectado altos niveles de expresión de ambas proteínas en el timo (Dustin *et al.*, 1998; Gout *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 1999).

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha identificado por primera vez a la familia de proteínas Cin85/CMS como ligandos intracelulares de la cadena pT α . Estas interacciones se han identificado tanto mediante ensayos de unión *in vitro* como mediante aproximaciones *in vivo*, al menos para CMS. Ambas proteínas son capaces de interaccionar, a través de sus dominios SH3, con el motivo consenso PX(P/A)XXR o PXXXPR para la unión de estas proteínas presente en el tallo intracitoplásmico de la cadena pT α (Pro2, **Figura 25A**). Nuestros datos muestran una mayor afinidad de CMS que de Cin85 en la interacción con pT α , lo que explicaría la dificultad para detectar la unión *in vivo* entre Cin85 y pT α . En la interacción entre CMS y pT α , los datos obtenidos mediante ensayos de unión *in vitro* muestran que tanto los dominios SH3 como la parte carboxilo terminal de CMS, que porta el motivo *coiled-coil* implicado en homodimerización (Kirsch *et al.*, 1999), son necesarios para una unión eficiente de CMS a pT α . Los tres dominios SH3 de estas proteínas reconocen la misma secuencia consenso (Kowanetz *et al.*, 2003; Kurakin *et al.*, 2003), de manera que una única molécula de CMS podría, teóricamente, unirse a tres moléculas de pT α . La homodimerización a través de los dominios *coiled-coil* de dos moléculas de CMS promovería la agregación del pre-TCR. De esta manera CMS contribuiría, junto con la capacidad de homodimerización espontánea de la cadena pT α (Yamasaki *et al.*, 2006), en la creación de un entorno señalizador favorable para el pre-TCR (**Figura 44A**). De forma alternativa, recientemente se ha descrito que dos moléculas distintas de Cin85 o

CMS reconocen el mismo motivo consenso en Cbl, promoviendo la agregación de Cbl (Jozic *et al.*, 2005; Moncalian *et al.*, 2006). Un mecanismo similar podría existir en la unión de CMS a pTα (**Figura 44B**), promoviendo el agrupamiento del complejo y favoreciendo la señalización a través del pre-TCR.

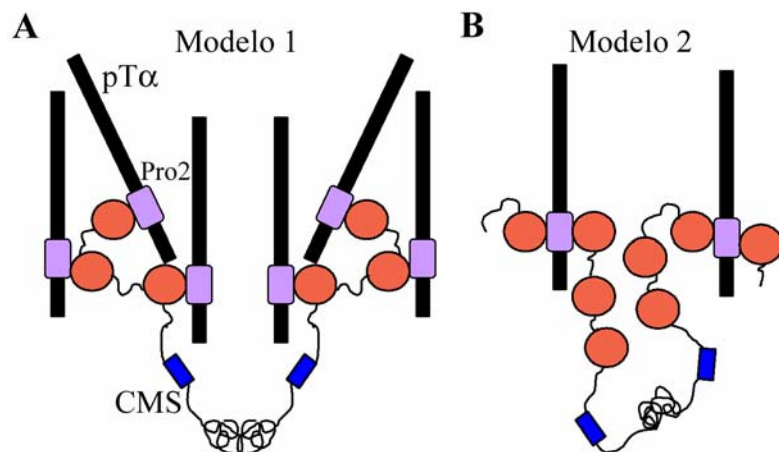


Figura 44. Modelo de la interacción entre pTα y CMS. A) Modelo 1 de unión, en el que cada dominio SH3 de CMS se une a una molécula de pTα distinta. B) Modelo 2 de unión, en el que dos moléculas de CMS se unen al motivo Pro2 de la misma molécula de pTα.

El motivo de unión de CMS y Cin85 en el dominio citoplásmico de la cadena pTα no parece estar presente en la cadena pTα de ratón. Sin embargo, no puede excluirse la existencia de un motivo funcional equivalente que no se revele en la secuencia lineal o estructura primaria de la cadena pTα de ratón, sino que se forme en la estructura secundaria o terciaria, siendo difícil su detección mediante el alineamiento de la secuencia de ambas proteínas.

Los análisis mediante coimmunoprecipitación entre CMS y pTα muestran una asociación constitutiva, que apoya la señalización autónoma del complejo pre-TCR. La baja cantidad de CMS coimmunoprecipitada con pTα daría cuenta de los bajos niveles del complejo pre-TCR que se expresa en la membrana. Una parte de las asociaciones descritas entre CMS y otras proteínas como las endofilinas son constitutivas, principalmente, las que se establecen a través de los dominios ricos en prolina de CMS. Sin embargo, las interacciones descritas a través de los dominios SH3 de CMS, como la unión a CD2 o a c-Cbl, se inducen tras la activación (Dikic y Giordano, 2003). En concreto, la interacción a través de los dominios SH3 de CMS con c-Cbl tras la estimulación del EGFR depende de la fosforilación en un residuo de tirosina en c-Cbl que tiene lugar tras la activación del receptor de la membrana (Kirsch *et al.*, 2001). En la interacción pTα/CMS, no observamos que la unión se induzca tras la activación con anticuerpos anti-CD3ε (**Figura 26B**). Estos datos pueden significar que a nivel basal, todo el receptor presente en la membrana ya está unido a CMS, y la activación no es capaz de exponer nuevos sitios de reclutamiento, o que estas técnicas bioquímicas no

son suficientemente sensibles para detectar cambios en la interacción, teniendo en cuenta los bajos niveles de expresión del complejo pre-TCR.

Nuestros datos de interacción *in vitro* e *in vivo* indican la interacción entre pT α y CMS estaría favorecida frente a la interacción con Cin85 o CD2BP3. Además, nuestro análisis de la regulación transcripcional de la expresión de los diferentes miembros de esta familia de adaptadores demuestran la existencia de mecanismos de control durante el desarrollo intratímico que determinan el aumento específico de los niveles de expresión de CMS en las poblaciones relacionadas con la expresión del pre-TCR frente a Cin85 y CD2BP3. En relación con este dato, hay que mencionar que la mayor parte de los estudios disponibles sobre la función de estas proteínas dentro del sistema inmune se refieren a CMS/CD2AP, lo que apoya un papel preferencial de CMS en el contexto del pre-TCR frente a Cin85 y CD2BP3. Teniendo en cuenta los datos expuestos, los ensayos funcionales para determinar la función de estas interacciones se han hecho únicamente con la proteína CMS.

Además de la asociación física entre CMS y pT α , también existe entre ellos una relación funcional, puesto que CMS se recluta junto con el citoesqueleto de actina, al sitio de activación del complejo pre-TCR (**Figuras 33 y 34**). Una situación similar tiene lugar tras la activación del TCR, puesto que la proteína homóloga a CMS en ratón, CD2AP, se ha visto que se recluta a la sinapsis inmunológica, aunque en este caso el reclutamiento depende de la interacción con CD2 a través de un dominio similar al que hemos descrito para pT α en este trabajo (Badour *et al.*, 2003; Dustin *et al.*, 1998; Zaru *et al.*, 2002). En células T maduras, CD2AP tiene un papel importante en la organización de la sinapsis inmunológica, excluyendo proteínas de gran tamaño como LFA1 o CD45 y promoviendo la acumulación del TCR en la zona central de la sinapsis, así como en el reclutamiento del centro organizador de microtúbulos o MTOC (Dustin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003). La ausencia de CD2AP (Lee *et al.*, 2003), o el bloqueo de la interacción de CD2 con su ligando (Zaru *et al.*, 2002) provoca alteraciones en la estructura de la sinapsis, puesto que no se produce el acúmulo central del TCR ni CD45 se encuentra excluido de esta zona. Aunque no se ha descrito la existencia de una estructura similar a la sinapsis inmunológica en el caso del pre-TCR, la oligomerización espontánea de este receptor, determinada por la estructura de su dominio extracelular (Yamasaki *et al.*, 2006), podría emular una o varias “microsinapsis” donde CMS estaría actuando como adaptador, por un lado excluyendo proteínas inhibitoras y por otro lado, reclutando proteínas necesarias para la señalización cerca del pre-TCR.

En nuestros estudios basados en la utilización de una proteína quimérica CMS-GFP, observamos que CMS se recluta a la zona de agregación del pre-TCR en la membrana al activar el complejo. Estos datos sugieren que no todos los sitios de unión a CMS en la molécula pT α estarían ocupados de forma basal, sino que CMS se reclutaría

de novo tras la activación inducida por anticuerpos anti-CD3 ϵ acoplados a esferas magnéticas (**Figura 34**). Sin embargo, previamente no habíamos conseguido detectar mediante coimmunoprecipitación un aumento de la asociación entre pT α y CMS en condiciones de estimulación con un anticuerpo anti-CD3 ϵ soluble. El reclutamiento de CMS que observamos es mucho más eficiente en el caso de usar bolas recubiertas con anti-CD3 ϵ que con el anticuerpo soluble (**Figura 34** respecto a **Figura 33**), por lo que en las coimmunoprecipitaciones nuestro escenario sería más parecido a la **Figura 33**, con la diferencia de que el agregamiento del pre-TCR en la membrana tiene lugar a los dos minutos de activación, mientras que las coimmunoprecipitaciones se llevaron a cabo tras activaciones más largas (5 minutos). Tras 5 minutos de activación, sabemos que la prácticamente el 80% del complejo que se marcó inicialmente con el anticuerpo en la membrana ya está dentro de la célula (**Figura 23B**, control y **Figura 37B**), por lo que la situación en realidad sería más parecido a la colocalización que observamos entre pT α internalizado y CMS en la **Figura 35**. CMS podría estar siendo reclutado a la membrana de forma muy rápida tras la activación del pre-TCR, y después ese reclutamiento se reduce a la colocalización entre pT α y CMS en vesículas de endocitosis. Las diferencias temporales entre los experimentos de coimmunoprecipitación y microscopía confocal pueden explicar que no hayamos visto inducción de la asociación por técnicas bioquímicas. Por otro lado, teniendo en cuenta la fuerte asociación de CMS con el citoesqueleto de actina (**Figuras 31 y 34**), es posible que por los métodos de lisis suave que hemos usado, estemos perdiendo parte de la interacción entre CMS y pT α , puesto que la actina polimerizada, así como las proteínas fuertemente asociadas a ella, son insolubles en los detergentes que hemos utilizado. De hecho, CMS es capaz de interaccionar directamente con actina, y una fracción bastante considerable de CMS se encuentra asociado al citoesqueleto de membrana (Lehtonen *et al.*, 2002). También existe la posibilidad de que la activación constitutiva del pre-TCR en condiciones fisiológicas de lugar a la formación de microagregados pre-TCR/CMS en la membrana, que se revelarían como un macroagregado tras la activación inducida con esferas recubierta de CD3 ϵ . En este caso, en la **Figura 34** estaríamos observando la concentración alrededor de la esfera del CMS que ya estaba previamente unido a pT α . Este modelo explicaría por qué no hemos visto un aumento de la asociación entre pT α y CMS mediante coimmunoprecipitación. En cualquiera de los dos escenarios, tras el reclutamiento inicial observamos la colocalización entre pT α y CMS en vesículas de endocitosis.

Los estudios sobre la distribución intracelular de CMS en la línea pre-T humana SupT1 muestra su presencia en un compartimento citosólico difuso cercano a la membrana que rodea toda la célula, pero se localiza mayoritariamente en vesículas intracelulares que forman parte de la ruta endocítica de estas células (**Figuras 31 y 32**).

Las vesículas que contienen CMS colocalizan fuertemente con actina polimerizada, y los datos que hemos obtenido mediante el uso de construcciones que codifican sólo para los dominios SH3 o para el dominio C-terminal de CMS fusionadas a GFP nos permiten concluir que la localización de CMS en estructuras vesiculares depende de su dominio C-terminal (**Figura 31**). Esta distribución vesicular parece específica de las células que expresan el pre-TCR, puesto que en células T que expresan un TCR maduro CMS presenta una distribución dispersa por el citosol o concentrada en la zona cercana la membrana, rodeando la célula (datos no mostrados y (Badour *et al.*, 2003; Zaru *et al.*, 2002)). Sin embargo, la acumulación de CMS en vesículas de endocitosis, colocalizando con actina polimerizada, se ha descrito en células epiteliales como COS7 o podocitos (Kirsch *et al.*, 1999; Welsch *et al.*, 2001), aunque no puede descartarse cierto grado de activación basal en estas células. Los datos obtenidos respecto a la cadena pT α internalizada muestran que durante su transporte hacia los lisosomas, pT α pasa por las vesículas que contienen CMS (**Figura 35**). Datos similares se han obtenido respecto al EGFR, en los que se ha visto que el receptor internalizado colocaliza con vesículas que contienen CMS y Cin85 (Lynch *et al.*, 2003; Soubeyran *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta estos datos, la presencia de vesículas endocíticas en la línea SupT1 podría indicar la existencia de procesos de endocitosis activos, como la internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR. En la actualidad, estamos realizando estudios dinámicos *in vivo* para analizar la cinética de formación de las estructuras vesiculares y su participación en el proceso de transporte de la cadena pT α . Nuestros datos favorecen la hipótesis de la interacción entre pT α y CMS tiene lugar en las vesículas recién formadas en la membrana como consecuencia de la activación constitutiva del pre-TCR. CMS podría ser reclutado por la cadena pT α que se expresa en la membrana a través de sus dominios SH3, reclutándose las endofilinas, implicadas en la formación de vesículas de endocitosis (Petrelli *et al.*, 2002; Soubeyran *et al.*, 2002), y el citoesqueleto de actina, necesario para el movimiento de esas vesículas dentro del citosol (Qualmann *et al.*, 2000) mediante su interacción con la parte C-terminal de CMS. Las vesículas de endocitosis encargadas de la internalización del complejo pre-TCR, acompañadas de CMS, se transportarían después hasta los lisosomas. Esta hipótesis está apoyada por el papel que se ha visto que desempeñan las proteínas de la familia Cin85/CMS en la internalización y degradación de receptores como el EGFR (Kirsch *et al.*, 2001), así como la interacción de CMS con actina y otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto como CAPZ y cortactina (Hutchings *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2003). Además, existen datos que relacionan a CMS con la GTPasa Rab4 y con el transporte de receptores desde los endosomas tempranos hacia los endosomas tardíos (Cormont *et al.*, 2003). Otros datos publicados recientemente demuestran que en ausencia de CD2AP, el complejo TCR no es capaz de degradarse en

linfocitos T tras la activación (Lee *et al.*, 2003), por lo que es lógico pensar que un mecanismo similar podría estar actuando sobre el pre-TCR.

Sin embargo, nuestros datos acerca de la degradación del complejo pre-TCR en ausencia del motivo de unión a CMS en el dominio intracitoplásmico de pT α muestran que la interacción directa entre CMS y pT α a través del Pro2 no parece estar implicada en la internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR. En este caso, no podemos descartar la posibilidad de que los abordajes experimentales utilizados no sean suficientemente sensibles para determinar la participación del motivo Pro2 en la degradación del complejo pre-TCR, aunque también es posible que CMS participe en la internalización y degradación del complejo pre-TCR mediante un mecanismo similar a que ocurre en el TCR, que no sería dependiente de la cadena pT α (Lee *et al.*, 2003).

En conjunto, nuestros datos permiten identificar a CMS como adaptador del pre-TCR. Además del papel descrito para Cin85 y CMS como proteínas adaptadoras en la internalización y degradación de receptores de membrana, también se ha descrito su participación en el proceso de señalización en células T maduras (Dustin *et al.*, 1998). Por ello, decidimos analizar el posible papel de la interacción entre pT α y CMS en la señalización a través del pre-TCR. Uno de los eventos más tempranos en la señalización del pre-TCR es su capacidad de aumentar la concentración intracelular de iones Ca²⁺. La señalización a través de calcio inducida por el pre-TCR es importante para la activación de los factores de transcripción NFAT y NF- κ B (Aifantis *et al.*, 2001), y en el caso del pre-TCR de ratón se ha visto que los motivos ricos en prolina en el tallo intracitoplásmico de pT α son necesarios para la movilización de calcio ante estímulos anti-CD3 (Aifantis *et al.*, 2002). Al analizar la movilización de calcio a través del pre-TCR, observamos que el motivo de unión a CMS (Pro2, SPRPQPR) en el dominio citoplásmico de pT α es necesario para una correcta señalización. Consecuentemente, las células en las que se ha eliminado el motivo de unión a CMS (JR-pT α Δ Pro2), tienen deficiencias en la actividad transcripcional de los factores NFAT y NF- κ B. Estos datos sugieren un papel activador de la interacción pT α /CMS en el proceso de señalización del pre-TCR. De acuerdo con este posible papel activador, hemos observado que la sobreexpresión de los tres dominios SH3 de CMS produce un aumento en la actividad transcripcional de NFAT. Además, este papel activador de CMS es específico de la unión al motivo Pro2 de unión a CMS de pT α , puesto que dicho aumento no tiene lugar cuando este motivo se elimina (**Figura 42, B y C**). Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína CMS completa reduce la actividad transcripcional de NFAT, lo que no concuerda con un papel activador de esta proteína. La sobreexpresión de CMS podría estar actuando como dominante negativo de la proteína CMS endógena, secuestrando proteínas necesarias para la activación del pre-TCR, aunque también es posible que

CMS tenga un papel dual, activador e inhibidor, dentro de la señalización a través del complejo pre-TCR. Este efecto inhibidor también se observa en ausencia del motivo de unión de CMS en pT α , lo que indica que este efecto es independiente de la interacción entre ambas proteínas.

Los datos que hemos obtenido con respecto a la función de CMS en la señalización del pre-TCR plantean una situación compleja: por un lado tenemos un papel activador de CMS, dependiente de su unión directa a pT α y por otro lado un papel inhibidor, independiente de la interacción directa pT α /CMS a través del motivo Pro2. Estos datos podrían sugerir que la sobreexpresión de CMS aumenta la activación a tiempos tempranos (efecto revelado mediante la sobreexpresión de los dominios SH3), e inhibe los eventos más tardíos, como se esquematiza en la **Figura 45A**. La posibilidad de que CMS tenga una función dual como activador e inhibidor ya se ha sugerido previamente en otros sistemas celulares. En los linfocitos T deficientes en CD2AP, la señalización a través del TCR en términos de fosforilación de TCR ζ y ZAP70 (Lee *et al.*, 2003) está retrasada, lo que indica una función activadora de CD2AP en los eventos tempranos de la señalización, pero tras el retraso inicial, la activación se mantiene durante más tiempo, lo que indica un papel inhibidor en eventos tardíos. Además del efecto sobre la fosforilación de TCR ζ y ZAP70, los linfocitos T deficientes en CD2AP presenta también defectos duales respecto la movilización de Ca²⁺, puesto que estas células movilizan menos calcio a tiempos tempranos en la activación (0-20 minutos), pero más a tiempos más tardíos (20-70 minutos), como se esquematiza en la **Figura 45B**. Este segundo papel inhibidor se ha relacionado con el bloqueo en la degradación del TCR en ausencia de CMS, ya que al no degradarse, señalizaría durante más tiempo (Lee *et al.*, 2003).

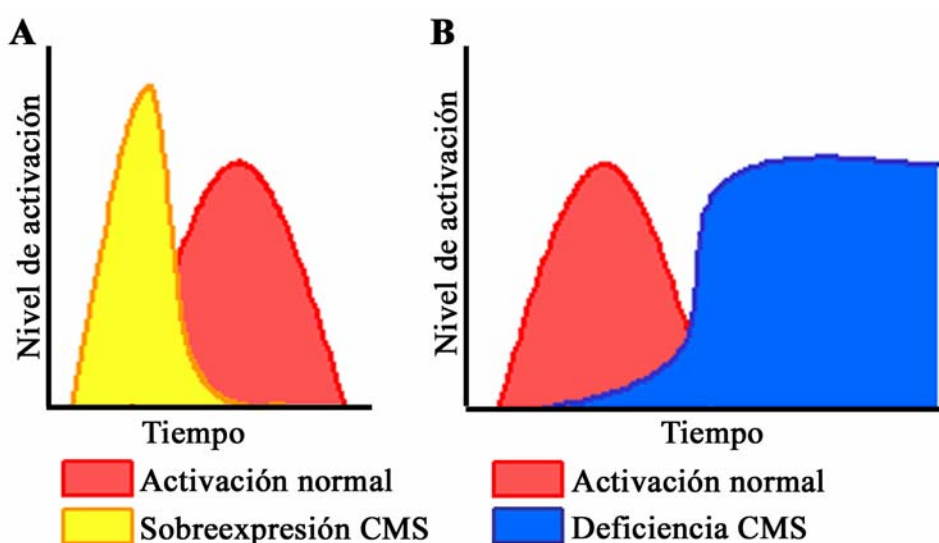


Figura 45. Representación esquemática de la activación en condiciones de sobreexpresión y ausencia de CMS. A) Comparación activación normal frente a la

sobreexpresión de CMS. **B)** Comparación de la activación normal frente a la deficiencia de CMS.

Una situación similar se ha visto para c-Cbl, una de las proteínas que interacciona con CMS. Cbl se ha considerado una proteína terminadora de la señal del TCR puesto que, debido a su capacidad ubiquitin-ligasa, induce la degradación, además del propio TCR, de proteínas señalizadoras como Lck y ZAP70 (Schmidt y Dikic, 2005; Wang *et al.*, 2001) e incluso se ha visto su participación en la degradación del pre-TCR en ratón (Panigada *et al.*, 2002). Sin embargo, también se ha visto que su presencia es necesaria para promover la actividad PI3-quinasa y para la fosforilación completa de PLC γ 1 inducida por el TCR (Braiman *et al.*, 2006; Naramura *et al.*, 2002; Naramura *et al.*, 1998).

Se ha propuesto que los efectos sobre la función del TCR observados en ausencia de CD2AP/CMS se deben a la falta de unión de CD2AP a la molécula coestimuladora CD2 (Lee *et al.*, 2003). Sin embargo, en linfocitos T normales en los que se bloquea la interacción de CD2 con su ligando en la célula presentadora, el único defecto que se observa es la ausencia de reclutamiento de CD2AP y la desorganización en la estructura de la sinapsis inmunológica. No se observan defectos en los eventos tempranos de la señalización ni se encuentra alterada la degradación del complejo TCR. Por tanto, dentro de la señalización a través del TCR, CD2AP tiene un papel independiente de su interacción con CD2, probablemente, mediante su interacción, directa o indirecta con el complejo TCR-CD3. Teniendo en cuenta estos datos, y los resultados que se han obtenido en este trabajo, proponemos un modelo sobre la función de CMS dentro de la señalización a través del pre-TCR (**Figura 46**):

1. Activación. Durante los eventos tempranos de la señalización CMS estaría reclutado al pre-TCR mediante su unión constitutiva a pT α a través del dominio Pro2. Esta unión reclutaría a c-Cbl, que promovería la activación de la fosfolipasa PLC γ 1 y/o la PI3-quinasa y la señalización a través del pre-TCR. Este papel activador de CMS explicaría los defectos en la movilización de Ca²⁺ y actividad transcripcional de NFAT y NF- κ B que observamos en ausencia del motivo de unión a CMS en el tallo intracelular de pT α (**Figuras 39, 40 y 41**), y el aumento de actividad transcripcional de NFAT al sobreexpresar los dominios SH3 de CMS (**Figura 42B**).

2. Inhibición. En eventos más tardíos de la activación c-Cbl sería reclutado al pre-TCR a través de ZAP70 y TCR ζ (Wang *et al.*, 2001), atrayendo a CMS. CMS estaría reclutando a las endofilinas y al citoesqueleto de actina, ejerciendo un papel inhibidor en la señalización al promover la degradación del complejo pre-TCR. En este segundo papel inhibidor, aunque la interacción directa con el motivo Pro2 de pT α no parece estar implicada, es posible que algún otro motivo del tallo citoplásmico de pT α

tenga algún papel, puesto que la degradación constitutiva del pre-TCR es una capacidad que reside en el dominio citoplásmico de pT α . Este dominio podría ser el Pro3, conservado entre humanos y ratón.

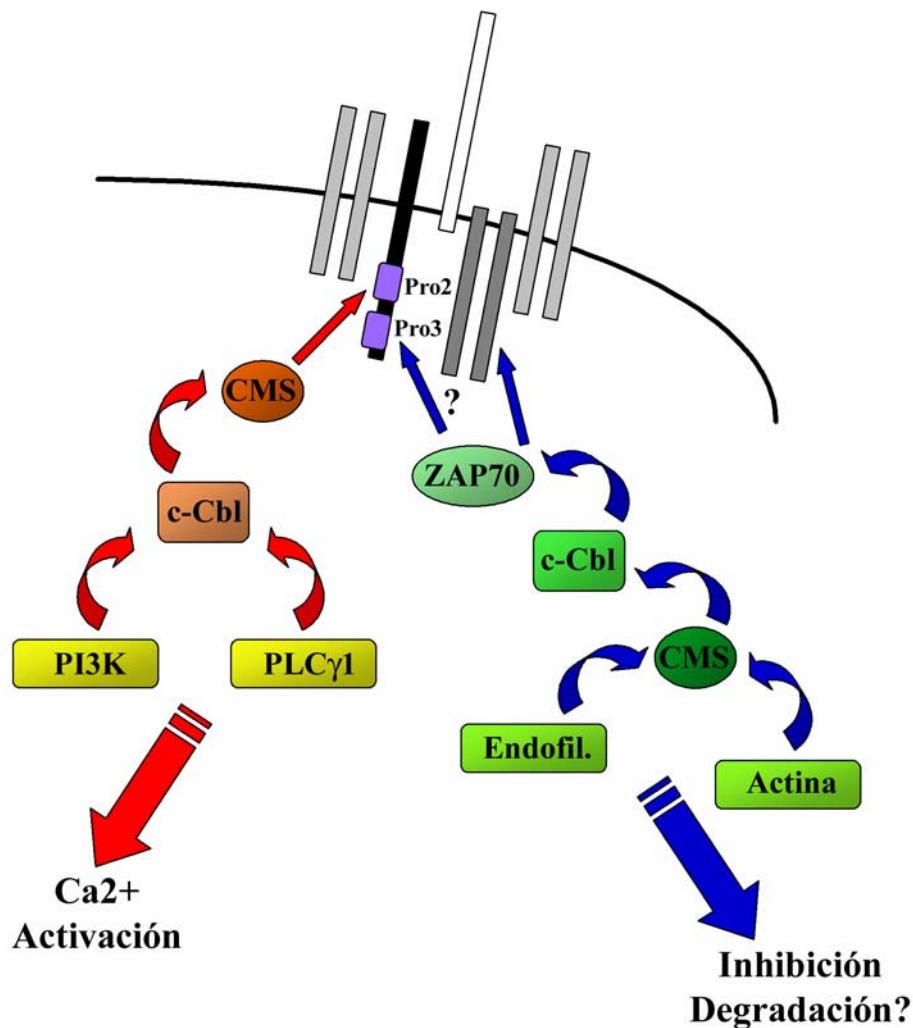


Figura 46. **Modelo del reclutamiento y función de CMS en el contexto de la señalización a través del pre-TCR.**

Dentro de este modelo de señalización, la sobreexpresión de los motivos SH3 de CMS expondría únicamente la función activadora, puesto que no sería capaz de promover la degradación del complejo pre-TCR al carecer de los motivos de unión a endofilinas y al citoesqueleto de actina, que se encuentran en la parte C-terminal de CMS. La sobreexpresión de la proteína CMS completa, aunque llevaría a cabo ambas funciones, revelaría la parte inhibidora de la función, puesto que sí sería capaz de promover la degradación del complejo. Este modelo de activación e inhibición, en las

que ambas funciones residen en las mismas proteínas, proporciona al pre-TCR la capacidad de comenzar y terminar su señal de forma autónoma.

El conjunto de los datos obtenidos durante este trabajo de Tesis Doctoral demuestran que la cadena $pT\alpha$, en concreto, su dominio citoplásmico, presenta características únicas que controlan la expresión en membrana y la señalización del complejo pre-TCR. Estas características exponen a la cadena $pT\alpha$ como componente imprescindible de la regulación del desarrollo de los linfocitos T.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expresión del complejo pre-TCR humano en la membrana es dependiente del aporte de proteínas de nueva síntesis, debido a que el complejo pre-TCR se internaliza y degrada de forma continua en los lisosomas de forma independiente de ligando.
2. El dominio citoplásmico de la cadena pT α es responsable del proceso de internalización y degradación constitutiva del complejo pre-TCR.
3. La internalización y transporte del complejo pre-TCR desde la membrana hasta los lisosomas es un proceso rápido que determina un tiempo de recambio de los complejos que se expresan en la membrana de 15-30 minutos en células pre-T *ex vivo*.
4. Los procesos de internalización y reciclaje del complejo pre-TCR son parcialmente dependientes de Src-quinasas, mientras que el transporte intracelular desde los endosomas tempranos hasta los lisosomas es totalmente dependiente de la actividad del citoesqueleto de actina.
5. Hemos identificado un motivo de rico en prolinas (SPRPQPR, Pro2) en el dominio citoplásmico de la cadena pT α humana que cumple la secuencia consenso de unión de los dominios SH3 de la familia de adaptadores Cin85/CMS. Este motivo interacciona *in vivo* con los tres dominios SH3 de la proteína adaptadora CMS, y recluta complejos multiproteicos formados por CMS, Cin85 y CD2BP3.
6. La activación del complejo pre-TCR induce el reclutamiento de la proteína CMS y el citoesqueleto de actina.
7. CMS se localiza en la ruta endocítica en células pre-T humanas, donde colocaliza con la cadena pT α internalizada desde la membrana.
8. El motivo de unión a CMS en la cadena pT α participa en la señalización a través del complejo pre-TCR, siendo necesario para la movilización de calcio y la actividad de los factores de transcripción NFAT y NF- κ B.

9. La sobreexpresión de los tres dominios SH3 de CMS incrementa la actividad transcripcional de NFAT ante la estimulación del complejo pre-TCR, y este efecto es específico de la presencia en pT α del motivo de unión a CMS.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aifantis, I., Borowski, C., Gounari, F., Lacorazza, H. D., Nikolich-Zugich, J., and von Boehmer, H. (2002). A critical role for the cytoplasmic tail of pTalpha in T lymphocyte development. *Nat Immunol* 3, 483-488.

Aifantis, I., Buer, J., von Boehmer, H., and Azogui, O. (1997). Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus. *Immunity* 7, 601-607.

Aifantis, I., Gounari, F., Scorrano, L., Borowski, C., and von Boehmer, H. (2001). Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT. *Nat Immunol* 2, 403-409.

Alarcon, B., Gil, D., Delgado, P., and Schamel, W. W. (2003). Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol Rev* 191, 38-46.

Alcover, A., and Alarcon, B. (2000). Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* 20, 325-346.

Andre, P., Boretto, J., Hueber, A. O., Regnier-Vigouroux, A., Gorvel, J. P., Ferrier, P., and Chavrier, P. (1997). A dominant-negative mutant of the Rab5 GTPase enhances T cell signaling by interfering with TCR down-modulation in transgenic mice. *J Immunol* 159, 5253-5263.

Arnaud, J., Huchenq, A., Vernhes, M. C., Caspar-Bauguil, S., Lenfant, F., Sancho, J., Terhorst, C., and Rubin, B. (1997). The interchain disulfide bond between TCR alpha beta heterodimers on human T cells is not required for TCR-CD3 membrane expression and signal transduction. *Int Immunol* 9, 615-626.

Badour, K., Zhang, J., Shi, F., McGavin, M. K., Rampersad, V., Hardy, L. A., Field, D., and Siminovitch, K. A. (2003). The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity* 18, 141-154.

Barber, D. F., Lopez, D., and Lopez de Castro, J. A. (1995). T cell receptor diversity in alloreactive responses against HLA-B27 (B*2705) is limited by multiple-level restrictions in both alpha and beta chains. *Eur J Immunol* 25, 2479-2485.

Bellavia, D., Campese, A. F., Checquolo, S., Balestri, A., Biondi, A., Cazzaniga, G., Lendahl, U., Fehling, H. J., Hayday, A. C., Frati, L., *et al.* (2002). Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3788-3793.

Berger, M. A., Dave, V., Rhodes, M. R., Bosma, G. C., Bosma, M. J., Kappes, D. J., and Wiest, D. L. (1997). Subunit composition of pre-T cell receptor complexes expressed by primary thymocytes: CD3 delta is physically associated but not functionally required. *J Exp Med* 186, 1461-1467.

Blanchard, N., Di Bartolo, V., and Hivroz, C. (2002). In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17, 389-399.

Blom, B., and Spits, H. (2006). Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 24, 287-320.

Borowski, C., Li, X., Aifantis, I., Gounari, F., and von Boehmer, H. (2004). Pre-TCRalpha and TCRalpha are not interchangeable partners of TCRbeta during T lymphocyte development. *J Exp Med* 199, 607-615.

Borst, J., Jacobs, H., and Brouns, G. (1996). Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 8, 181-190.

Braiman, A., Barda-Saad, M., Sommers, C. L., and Samelson, L. E. (2006). Recruitment and activation of PLCgamma1 in T cells: a new insight into old domains. *Embo J* 25, 774-784.

Bruno, L., Rocha, B., Rolink, A., von Boehmer, H., and Rodewald, H. R. (1995). Intra- and extra-thymic expression of the pre-T cell receptor alpha gene. *Eur J Immunol* 25, 1877-1882.

Cano, E., Canellada, A., Minami, T., Iglesias, T., and Redondo, J. M. (2005). Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J Biol Chem* 280, 29435-29443.

Carrasco, Y. R., Navarro, M. N., de Yebenes, V. G., Ramiro, A. R., and Toribio, M. L. (2002). Regulation of surface expression of the human pre-T cell receptor complex. *Semin Immunol* 14, 325-334.

Carrasco, Y. R., Navarro, M. N., and Toribio, M. L. (2003). A role for the cytoplasmic tail of the pre-T cell receptor (TCR) alpha chain in promoting constitutive internalization and degradation of the pre-TCR. *J Biol Chem* 278, 14507-14513.

Carrasco, Y. R., Ramiro, A. R., Trigueros, C., de Yebenes, V. G., Garcia-Peydro, M., and Toribio, M. L. (2001). An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor (TCR) alpha chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels. *J Exp Med* 193, 1045-1058.

Carrasco, Y. R., Trigueros, C., Ramiro, A. R., de Yebenes, V. G., and Toribio, M. L. (1999). Beta-selection is associated with the onset of CD8beta chain expression on CD4(+)CD8alphaalpha(+) pre-T cells during human intrathymic development. *Blood* 94, 3491-3498.

Carrera, A. C., Sanchez-Madrid, F., Lopez-Botet, M., Bernabeu, C., and De Landazuri, M. O. (1987). Involvement of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation. *Eur J Immunol* 17, 179-186.

Cheng, A. M., and Chan, A. C. (1997). Protein tyrosine kinases in thymocyte development. *Curr Opin Immunol* 9, 528-533.

Cheng, A. M., Negishi, I., Anderson, S. J., Chan, A. C., Bolen, J., Loh, D. Y., and Pawson, T. (1997). The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9797-9801.

Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 6, 629-662.

Cormont, M., Meton, I., Mari, M., Monzo, P., Keslair, F., Gaskin, C., McGraw, T. E., and Le Marchand-Brustel, Y. (2003). CD2AP/CMS regulates endosome morphology and traffic to the degradative pathway through its interaction with Rab4 and c-Cbl. *Traffic* 4, 97-112.

Dave, V. P., Cao, Z., Browne, C., Alarcon, B., Fernandez-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S., and Kappes, D. J. (1997). CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *Embo J* 16, 1360-1370.

De Smedt, M., Hoebeke, I., Reynvoet, K., Leclercq, G., and Plum, J. (2005). Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood* 106, 3498-3506.

de Yebenes, V. G., Carrasco, Y. R., Ramiro, A. R., and Toribio, M. L. (2002). Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. *Blood* 99, 2948-2956.

DeJarnette, J. B., Sommers, C. L., Huang, K., Woodside, K. J., Emmons, R., Katz, K., Shores, E. W., and Love, P. E. (1998). Specific requirement for CD3epsilon in T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14909-14914.

Del Porto, P., Bruno, L., Mattei, M. G., von Boehmer, H., and Saint-Ruf, C. (1995). Cloning and comparative analysis of the human pre-T-cell receptor alpha-chain gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12105-12109.

Delgado, P., and Alarcon, B. (2005). An orderly inactivation of intracellular retention signals controls surface expression of the T cell antigen receptor. *J Exp Med* 201, 555-566.

Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A. M., Pedersen, L. O., Odum, N., and Geisler, C. (1996). Molecular characterization of the di-leucine-based internalization motif of the T cell receptor. *J Biol Chem* 271, 11441-11448.

Dikic, I. (2002). CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Lett* 529, 110-115.

Dikic, I., and Giordano, S. (2003). Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* 15, 128-135.

D'Oro, U., Vacchio, M. S., Weissman, A. M., and Ashwell, J. D. (1997). Activation of the Lck tyrosine kinase targets cell surface T cell antigen receptors for lysosomal degradation. *Immunity* 7, 619-628.

Dudley, E. C., Petrie, H. T., Shah, L. M., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1994). T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1, 83-93.

Dustin, M. L., Olszowy, M. W., Holdorf, A. D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P. A., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94, 667-677.

Falk, I., Biro, J., Kohler, H., and Eichmann, K. (1996). Proliferation kinetics associated with T cell receptor-beta chain selection of fetal murine thymocytes. *J Exp Med* 184, 2327-2339.

Fehling, H. J., Iritani, B. M., Krotkova, A., Forbush, K. A., Laplace, C., Perlmutter, R. M., and von Boehmer, H. (1997). Restoration of thymopoiesis in pT alpha-/- mice by anti-CD3epsilon antibody treatment or with transgenes encoding activated Lck or tailless pT alpha. *Immunity* 6, 703-714.

Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., and von Boehmer, H. (1995). Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* 375, 795-798.

Garcia-Peydro, M., de Yebenes, V. G., and Toribio, M. L. (2003). Sustained Notch1 signaling instructs the earliest human intrathymic precursors to adopt a gammadelta T-cell fate in fetal thymus organ culture. *Blood* 102, 2444-2451.

Gibbons, D., Douglas, N. C., Barber, D. F., Liu, Q., Sullo, R., Geng, L., Fehling, H. J., von Boehmer, H., and Hayday, A. C. (2001). The biological activity of natural and mutant pTalpha alleles. *J Exp Med* 194, 695-703.

Gounari, F., Aifantis, I., Martin, C., Fehling, H. J., Hoefflinger, S., Leder, P., von Boehmer, H., and Reizis, B. (2002). Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene. *Nat Immunol* 3, 489-496.

Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N. N., Drobot, L. B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A. M., Waterfield, M., and Buchman, V. L. (2000). Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *Embo J* 19, 4015-4025.

Groettrup, M., Baron, A., Griffiths, G., Palacios, R., and von Boehmer, H. (1992). T cell receptor (TCR) beta chain homodimers on the surface of immature but not mature alpha, gamma, delta chain deficient T cell lines. *Embo J* 11, 2735-2745.

Groves, T., Smiley, P., Cooke, M. P., Forbush, K., Perlmutter, R. M., and Guidos, C. J. (1996). Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development. *Immunity* 5, 417-428.

Haks, M. C., Belkowski, S. M., Ciofani, M., Rhodes, M., Lefebvre, J. M., Trop, S., Hugo, P., Zuniga-Pflucker, J. C., and Wiest, D. L. (2003). Low activation threshold as a mechanism for ligand-independent signaling in pre-T cells. *J Immunol* 170, 2853-2861.

Haks, M. C., Krimpenfort, P., Borst, J., and Kruisbeek, A. M. (1998). The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha and TCRgamma lineages. *Embo J* 17, 1871-1882.

Haks, M. C., Krimpenfort, P., van den Brakel, J. H., and Kruisbeek, A. M. (1999). Pre-TCR signaling and inactivation of p53 induces crucial cell survival pathways in pre-T cells. *Immunity* 11, 91-101.

Hayday, A. C., Barber, D. F., Douglas, N., and Hoffman, E. S. (1999). Signals involved in gamma/delta T cell versus alpha/beta T cell lineage commitment. *Semin Immunol* 11, 239-249.

Hoffman, E. S., Passoni, L., Crompton, T., Leu, T. M., Schatz, D. G., Koff, A., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1996). Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev* 10, 948-962.

Hutchings, N. J., Clarkson, N., Chalkley, R., Barclay, A. N., and Brown, M. H. (2003). Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *J Biol Chem* 278, 22396-22403.

- Irving, B. A., Alt, F. W., and Killeen, N. (1998). Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280, 905-908.
- Jacobs, H., Vandeputte, D., Tolkamp, L., de Vries, E., Borst, J., and Berns, A. (1994). CD3 components at the surface of pro-T cells can mediate pre-T cell development in vivo. *Eur J Immunol* 24, 934-939.
- Jozic, D., Cardenes, N., Deribe, Y. L., Moncalian, G., Hoeller, D., Groemping, Y., Dikic, I., Rittinger, K., and Bravo, J. (2005). Cbl promotes clustering of endocytic adaptor proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 972-979.
- Kirsch, K. H., Georgescu, M. M., Ishimaru, S., and Hanafusa, H. (1999). CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6211-6216.
- Kirsch, K. H., Georgescu, M. M., Shishido, T., Langdon, W. Y., Birge, R. B., and Hanafusa, H. (2001). The adapter type protein CMS/CD2AP binds to the proto-oncogenic protein c-Cbl through a tyrosine phosphorylation-regulated Src homology 3 domain interaction. *J Biol Chem* 276, 4957-4963.
- Kisielow, P., and von Boehmer, H. (1995). Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 58, 87-209.
- Kosugi, A., Noda, S., Saitoh, S., Narumiya, S., Ogata, M., Hashimoto, Y., Takase, K., Saito, T., and Hamaoka, T. (1997). Subunit composition of the pre-T-cell receptor complex analysed by monoclonal antibody against the pre-T-cell receptor alpha chain. *Immunology* 91, 618-622.
- Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Haglund, K., Kowanetz, M., Husnjak, K., Taylor, J. D., Soubeyran, P., Engstrom, U., Ladbury, J. E., and Dikic, I. (2003). Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 278, 39735-39746.
- Kurakin, A. V., Wu, S., and Bredesen, D. E. (2003). Atypical recognition consensus of CIN85/SETA/Ruk SH3 domains revealed by target-assisted iterative screening. *J Biol Chem* 278, 34102-34109.

Lacorazza, H. D., Porritt, H. E., and Nikolich-Zugich, J. (2001). Dysregulated expression of pre-Talpha reveals the opposite effects of pre-TCR at successive stages of T cell development. *J Immunol* 167, 5689-5696.

Lee, K. H., Dinner, A. R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T. N., Burack, W. R., Wu, H., Wang, J., *et al.* (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 302, 1218-1222.

Lehtonen, S., Ora, A., Olkkonen, V. M., Geng, L., Zerial, M., Somlo, S., and Lehtonen, E. (2000). In vivo interaction of the adapter protein CD2-associated protein with the type 2 polycystic kidney disease protein, polycystin-2. *J Biol Chem* 275, 32888-32893.

Lehtonen, S., Zhao, F., and Lehtonen, E. (2002). CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F734-743.

Lin, K., Longo, N. S., Wang, X., Hewitt, J. A., and Abraham, K. M. (2000). Lck domains differentially contribute to pre-T cell receptor (TCR)- and TCR-alpha/beta-regulated developmental transitions. *J Exp Med* 191, 703-716.

Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L., and Vignali, D. A. (2000). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13, 665-675.

Longva, K. E., Blystad, F. D., Stang, E., Larsen, A. M., Johannessen, L. E., and Madhus, I. H. (2002). Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol* 156, 843-854.

Lynch, D. K., Winata, S. C., Lyons, R. J., Hughes, W. E., Lehrbach, G. M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S., and Daly, R. J. (2003). A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278, 21805-21813.

Malissen, B., Ardouin, L., Lin, S. Y., Gillet, A., and Malissen, M. (1999). Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv Immunol* 72, 103-148.

Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E., and Malissen, B. (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *Embo J* 14, 4641-4653.

Marquez, C., Trigueros, C., Fernandez, E., and Toribio, M. L. (1995). The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J Exp Med* 181, 475-483.

Marquez, C., Trigueros, C., Franco, J. M., Ramiro, A. R., Carrasco, Y. R., Lopez-Botet, M., and Toribio, M. L. (1998). Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 91, 2760-2771.

Martin, S., and Bevan, M. J. (1998). Transient alteration of T cell fine specificity by a strong primary stimulus correlates with T cell receptor down-regulation. *Eur J Immunol* 28, 2991-3002.

Mayer, B. J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 114, 1253-1263.

Mombaerts, P., Clarke, A. R., Rudnicki, M. A., Iacomini, J., Itohara, S., Lafaille, J. J., Wang, L., Ichikawa, Y., Jaenisch, R., Hooper, M. L., and et al. (1992). Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 360, 225-231.

Mombaerts, P., Terhorst, C., Jacks, T., Tonegawa, S., and Sancho, J. (1995). Characterization of immature thymocyte lines derived from T-cell receptor or recombination activating gene 1 and p53 double mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7420-7424.

Moncalian, G., Cardenes, N., Deribe, Y. L., Spinola-Amilibia, M., Dikic, I., and Bravo, J. (2006). Atypical polyproline recognition by the CMS N-terminal SH3 domain. *J Biol Chem*.

Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., and He, H. T. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* 17, 5334-5348.

- Naramura, M., Jang, I. K., Kole, H., Huang, F., Haines, D., and Gu, H. (2002). c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* 3, 1192-1199.
- Naramura, M., Kole, H. K., Hu, R. J., and Gu, H. (1998). Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15547-15552.
- Niedergang, F., Hemar, A., Hewitt, C. R., Owen, M. J., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (1995). The *Staphylococcus aureus* enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J Biol Chem* 270, 12839-12845.
- Niedergang, F., San Jose, E., Rubin, B., Alarcon, B., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (1997). Differential cytosolic tail dependence and intracellular fate of T-cell receptors internalized upon activation with superantigen or phorbol ester. *Res Immunol* 148, 231-245.
- O'Shea, C. C., Thornell, A. P., Rosewell, I. R., Hayes, B., and Owen, M. J. (1997). Exit of the pre-TCR from the ER/cis-Golgi is necessary for signaling differentiation, proliferation, and allelic exclusion in immature thymocytes. *Immunity* 7, 591-599.
- Panigada, M., Porcellini, S., Barbier, E., Hoeflinger, S., Cazenave, P. A., Gu, H., Band, H., von Boehmer, H., and Grassi, F. (2002). Constitutive endocytosis and degradation of the pre-T cell receptor. *J Exp Med* 195, 1585-1597.
- Penas, P. F., Garcia-Diez, A., Sanchez-Madrid, F., and Yanez-Mo, M. (2000). Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration. *J Invest Dermatol* 114, 1126-1135.
- Penit, C., Lucas, B., and Vasseur, F. (1995). Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol* 154, 5103-5113.
- Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 416, 187-190.

Pivniouk, V., Tsitsikov, E., Swinton, P., Rathbun, G., Alt, F. W., and Geha, R. S. (1998). Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell* 94, 229-238.

Qualmann, B., Kessels, M. M., and Kelly, R. B. (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 150, F111-116.

Ramiro, A. R., Navarro, M. N., Carreira, A., Carrasco, Y. R., de Yebenes, V. G., Carrillo, G., San Millan, J. L., Rubin, B., and Toribio, M. L. (2001). Differential developmental regulation and functional effects on pre-TCR surface expression of human pTalpha(a) and pTalpha(b) spliced isoforms. *J Immunol* 167, 5106-5114.

Ramiro, A. R., Trigueros, C., Marquez, C., San Millan, J. L., and Toribio, M. L. (1996). Regulation of pre-T cell receptor (pT alpha-TCR beta) gene expression during human thymic development. *J Exp Med* 184, 519-530.

Reynolds, T. C., Smith, S. D., and Sklar, J. (1987). Analysis of DNA surrounding the breakpoints of chromosomal translocations involving the beta T cell receptor gene in human lymphoblastic neoplasms. *Cell* 50, 107-117.

Rocca, A., Lamaze, C., Subtil, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Involvement of the ubiquitin/proteasome system in sorting of the interleukin 2 receptor beta chain to late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* 12, 1293-1301.

Sahuquillo, A. G., Roumier, A., Teixeira, E., Bragado, R., and Alarcon, B. (1998). T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP70/CD3-zeta association. *J Exp Med* 187, 1179-1192.

Saint-Ruf, C., Panigada, M., Azogui, O., Debey, P., von Boehmer, H., and Grassi, F. (2000). Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature* 406, 524-527.

Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266, 1208-1212.

Salio, M., Valitutti, S., and Lanzavecchia, A. (1997). Agonist-induced T cell receptor down-regulation: molecular requirements and dissociation from T cell activation. *Eur J Immunol* 27, 1769-1773.

San Jose, E., Borroto, A., Niedergang, F., Alcover, A., and Alarcon, B. (2000). Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity* 12, 161-170.

Schmidt, M. H., and Dikic, I. (2005). The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 907-919.

Shih, N. Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M. L., Kanagawa, O., Miner, J. H., and Shaw, A. S. (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286, 312-315.

Shores, E. W., Huang, K., Tran, T., Lee, E., Grinberg, A., and Love, P. E. (1994). Role of TCR zeta chain in T cell development and selection. *Science* 266, 1047-1050.

Shortman, K., and Wu, L. (1996). Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* 14, 29-47.

Sommers, C. L., Dejarnette, J. B., Huang, K., Lee, J., El-Khoury, D., Shores, E. W., and Love, P. E. (2000). Function of CD3 epsilon-mediated signals in T cell development. *J Exp Med* 192, 913-919.

Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416, 183-187.

Talora, C., Campese, A. F., Bellavia, D., Pascucci, M., Checquolo, S., Groppioni, M., Frati, L., von Boehmer, H., Gulino, A., and Screpanti, I. (2003). Pre-TCR-triggered ERK signalling-dependent downregulation of E2A activity in Notch3-induced T-cell lymphoma. *EMBO Rep* 4, 1067-1072.

Talora, C., Cialfi, S., Oliviero, C., Palermo, R., Pascucci, M., Frati, L., Vacca, A., Gulino, A., and Screpanti, I. (2006). Cross talk among Notch3, pre-TCR, and Tal1 in T-cell development and leukemogenesis. *Blood* 107, 3313-3320.

Tibaldi, E. V., and Reinherz, E. L. (2003). CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. *Int Immunol* 15, 313-329.

Torres, P. S., Alcover, A., Zapata, D. A., Arnaud, J., Pacheco, A., Martin-Fernandez, J. M., Villasevil, E. M., Sanal, O., and Regueiro, J. R. (2003). TCR dynamics in human mature T lymphocytes lacking CD3 gamma. *J Immunol* 170, 5947-5955.

Trigueros, C., Ramiro, A. R., Carrasco, Y. R., de Yebenes, V. G., Albar, J. P., and Toribio, M. L. (1998). Identification of a late stage of small noncycling pTalpha- pre-T cells as immediate precursors of T cell receptor alpha/beta+ thymocytes. *J Exp Med* 188, 1401-1412.

Trop, S., Steff, A. M., Denis, F., Wiest, D. L., and Hugo, P. (1999). The connecting peptide domain of pT alpha dictates weak association of the pre-T cell receptor with the TCR zeta subunit. *Eur J Immunol* 29, 2187-2196.

Valitutti, S., Muller, S., Salio, M., and Lanzavecchia, A. (1997). Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 185, 1859-1864.

van Oers, N. S., von Boehmer, H., and Weiss, A. (1995). The pre-T cell receptor (TCR) complex is functionally coupled to the TCR-zeta subunit. *J Exp Med* 182, 1585-1590.

Voll, R. E., Jimi, E., Phillips, R. J., Barber, D. F., Rincon, M., Hayday, A. C., Flavell, R. A., and Ghosh, S. (2000). NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity* 13, 677-689.

von Boehmer, H. (2005). Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* 5, 571-577.

von Boehmer, H., and Fehling, H. J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 15, 433-452.

Wang, H. Y., Altman, Y., Fang, D., Elly, C., Dai, Y., Shao, Y., and Liu, Y. C. (2001). Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70. *J Biol Chem* 276, 26004-26011.

Watanabe, S., Take, H., Takeda, K., Yu, Z. X., Iwata, N., and Kajigaya, S. (2000). Characterization of the CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 167-174.

Welsch, T., Endlich, N., Kriz, W., and Endlich, K. (2001). CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 281, F769-777.

Wilson, A., and MacDonald, H. R. (1995). Expression of genes encoding the pre-TCR and CD3 complex during thymus development. *Int Immunol* 7, 1659-1664.

Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Ogata, K., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Wiest, D. L., Tokunaga, M., and Saito, T. (2006). Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol* 7, 67-75.

Zaru, R., Cameron, T. O., Stern, L. J., Muller, S., and Valitutti, S. (2002). Cutting edge: TCR engagement and triggering in the absence of large-scale molecular segregation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* 168, 4287-4291.

ANEXO

ANEXO

El trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Ramiro A.R, **Navarro M.N**, Carreira A, Carrasco Y.R, G. de Yébenes V, Carrillo G, San Millán J.L, Rubin B, and Toribio M.L. “Differential Developmental Regulation and Functional Effects on pre-TCR Surface Expression of Human pTα^a and pTα^b Spliced Isoforms”. The Journal of Immunology, 2001. 167: 5106-5114.

- Carrasco Y.R, **Navarro M.N**, G. de Yébenes V., Ramiro A.R, and Toribio M.L. “Regulation of surface expression of the human pre-T cell receptor complex”. Seminars in Immunology, 2002. 14: 325-334.

- **Navarro M.N**, Carrasco Y.R, and Toribio M.L. “A role for the cytoplasmic tail of the pre-T cell receptor alpha chain in promoting constitutive internalization and degradation of the pre-TCR”. The Journal of Biological Chemistry, 2003. 278: 14507-14513.

- Zapata D.A., Schamel W.W.A., Torres P.S, Alarcón B., Rossi N.E., **Navarro M.N.**, Toribio M.L. and Regueiro J.R. “Biochemical differences in the αβ TCR-CD3 surface complex between CD8⁺ and CD4⁺ human mature T lymphocytes”. The Journal of Biological Chemistry, 2004. 279: 24485-24492.

- **María N. Navarro**, Gretel Nusspaumer, Patricia Fuentes, and María L. Toribio. “Identification of a functional binding site for Cin85/CMS adaptors in the human pre-TCRα cytoplasmic tail”. (en revisión)

Differential Developmental Regulation and Functional Effects on Pre-TCR Surface Expression of Human pT α^a and pT α^b Spliced Isoforms¹

Almudena R. Ramiro,* María N. Navarro,* Aura Carreira,* Yolanda R. Carrasco,* Virginia G. de Yébenes,* Graciela Carrillo,* José L. San Millán,[†] Bent Rubin,[‡] and María L. Toribio^{2*}

Functional rearrangement at the TCR β locus leads to surface expression on developing pre-T cells of a pre-TCR complex composed of the TCR β -chain paired with the invariant pre-TCR α (pT α) chain and associated with CD3 components. Pre-TCR signaling triggers the expansion and further differentiation of pre-T cells into TCR $\alpha\beta$ mature T cells, a process known as β selection. Besides the conventional pT α transcript (termed pT α^a), a second, alternative spliced, isoform of the pT α gene (pT α^b) has been described, whose developmental relevance remains unknown. In this study, phenotypic, biochemical, and functional evidence is provided that only pT α^a is capable of inducing surface expression of a CD3-associated pre-TCR complex, which seems spontaneously recruited into lipid rafts, while pT α^b pairs with and retains TCR β intracellularly. In addition, by using real-time quantitative RT-PCR approaches, we show that expression of pT α^a and pT α^b mRNA spliced products is differentially regulated along human intrathymic development, so that pT α^b transcriptional onset is developmentally delayed, but β selection results in simultaneous shutdown of both isoforms, with a relative increase of pT α^b transcripts in β -selected vs nonselected pre-T cells in vivo. Relative increase of pT α^b is also shown to occur upon pre-T cell activation in vitro. Taken together, our data illustrate that transcriptional regulation of pT α limits developmental expression of human pre-TCR to intrathymic stages surrounding β selection, and are compatible with a role for pT α^b in forming an intracellular TCR β -pT α^b complex that may be responsible for limiting surface expression of a pT α^a -containing pre-TCR and/or may be competent to signal from a subcellular compartment. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 5106–5114.

Progenitors of $\alpha\beta$ T lymphocytes that differentiate inside the thymus have to face at least two selection steps that involve signaling through two molecular sensors, the pre-TCR and the $\alpha\beta$ TCR, which are sequentially expressed during intrathymic development (reviewed in Refs. 1–3). Early thymocytes that succeed in a functional rearrangement at the TCR β locus express first a pre-TCR complex composed of the TCR β chain paired with a nonrearranging pre-TCR α (pT α)³ chain and associated with CD3 components (4–7), which triggers the developmental checkpoint generally referred to as β selection. Pre-TCR-mediated β selection involves the survival and proliferation of those

thymocytes carrying a productive TCR β gene rearrangement, and the feedback inhibition of further rearrangements (allelic exclusion) at this locus (8–13). Following β selection, pre-TCR-mediated cellular expansion ends up abruptly, and TCR α rearrangements are then induced in the resulting population of small nondividing pre-T cells (14, 15). On productive TCR α gene rearrangements and substitution of pT α by TCR α , the $\alpha\beta$ TCR is expressed associated with CD3 on the membrane of developing thymocytes, which are then allowed to undergo a second step of selection (positive or TCR $\alpha\beta$ selection), which results in rescue from programmed cell death and final differentiation into mature $\alpha\beta$ T cells (2).

Most of the information regarding the functional expression of the pre-TCR in thymocyte development arises from approaches involving targeted disruption of components critical for the generation and assembly of the murine pre-TCR (16–18). Available data support that activity of the pre-TCR begins in CD44^{+/–} CD25⁺ thymocytes, when pT α transcription is maximal (5) and functional TCR β chain rearrangements are achieved (8, 19). However, actual detection of the pre-TCR on normal murine thymocytes has been elusive, mostly because the pre-TCR is expressed at very low levels (reviewed in Ref. 13), and up-to-date unambiguous biochemical evidence of a surface pre-TCR has only been obtained from TCR α -deficient mice (4, 7). This barely detectable level of surface pre-TCR led us to wonder whether expression on the membrane of thymocytes was indeed essential for the β selection process. Supporting the requirement of a surface pre-TCR, it was shown that the TCR β chain has to exit the endoplasmic reticulum (ER) compartment to induce differentiation, cellular proliferation, and TCR β allelic exclusion (20). However, pre-TCR ligand binding

*Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain; [†]Genetics Unit, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; and [‡]Centre National de la Recherche Scientifique, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France

Received for publication April 30, 2001. Accepted for publication August 21, 2001.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF 97-0161), Dirección General de Enseñanza Superior (PB97-1194), Comunidad Autónoma de Madrid (08.3/0015.1/99 and 08.3/0021/2000), and Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 00/1044), and by an institutional grant from the Fundación Ramón Areces. A.R.R. is supported by a postdoctoral fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. María L. Toribio, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. E-mail address: mtoribio@cbm.uam.es

³ Abbreviations used in this paper: pT α , pre-TCR α ; DP, double-positive; EGFP, enhanced GFP; ER, endoplasmic reticulum; GFP, green fluorescent protein; IRES, internal ribosomal entry site; PDI, protein disulfide isomerase; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate.

seems dispensable for its function, as T cell development was shown to be independent of pre-TCR extracellular Ig domains (21, 22). In this regard, it has recently been suggested that the pre-TCR could be endowed with constitutive activation properties, as it was found to be spontaneously recruited into lipid rafts enriched in activated signaling transducing molecules (23).

In contrast to mice, most of the information regarding pre-TCR expression in humans must be derived from direct analysis of *ex vivo* isolated normal thymocytes. Following such approaches, we have recently succeeded in the detection of surface pT α expression on primary human thymocytes (15), and showed that it was confined *in vivo* to a limited fraction of CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) cycling thymocytes that coexpress low surface CD3. As CD3^{low} cycling DP thymocytes are the immediate progeny of CD4⁺CD8 α ⁺ pre-T cells (24), in which TCR β rearrangements are first induced in humans (25), they represent the most immature β -selected pre-T cells. Pre-TCR surface expression is then rapidly down-regulated from the surface of β -selected thymocytes that stop cycling and eventually become small resting cells, this coinciding with the onset of TCR α rearrangements (15).

Despite the restricted developmental window of cell surface pre-TCR expression, pT α transcription has been shown to span, both in mice and humans, all pre-T cell stages and to diminish only immediately before the single-positive stage (5, 26). Regulation of surface pre-TCR expression is therefore still an open question. In this regard, a second, alternatively spliced, isoform of pT α , termed pT α^b , has been described recently; this isoform lacks the second pT α exon, coding for most of the extracellular Ig-like domain, but retains the cysteine residue presumably involved in TCR β binding (27). pT α^b is coexpressed in the murine thymus with the conventional pT α^a isoform, although at significantly (~10-fold) lower levels (27). Conservation of this pT α^b alternatively processed transcript in humans (28) suggests that it may play an important role in thymocyte development. At present, the only available data on the putative function of pT α^b come from studies in mice showing that each pT α isoform has functionally distinct effects on TCR β -chain expression on transfected cells (27). These data led to the proposal that pT α^b may be more efficient than pT α^a in bringing TCR β to the cell surface, allowing higher expression of TCR β as part of an alternative CD3-associated functional pre-TCR. However, the regulation of pT α^b expression throughout T cell development has not been directly addressed as yet and, therefore, the physiological relevance of such an alternative pre-TCR remains to be determined.

In this study, real-time quantitative RT-PCR analyses provide evidence that developmental expression of pT α^a and pT α^b RNA spliced products is differentially regulated in the human thymus, so that maximal pT α^b transcription is delayed as compared with pT α^a , although both pT α isoforms drop simultaneously immediately following β selection. Moreover, our biochemical and functional studies support that, in contrast to mice, only pT α^a can promote the expression of a functional surface pre-TCR in humans. The possibility that pT α^b plays a role in regulating surface pre-TCR expression, and/or forms a pre-TCR complex competent to signal from an inner compartment is discussed.

Materials and Methods

cDNA constructs, cell lines, and transfections

The human pT α^a and pT α^b full-length cDNAs were generated by amplification of total thymus cDNA with the sense 5'-GGG CCC GGA TCC ATA TGG CCG GTA CAT GGC TG-3' and antisense 5'-GGG GGA TCC CCG GCA GCT CCA GCC TGC AG-3' primers, followed by digestion and ligation into the *Bam*HI site of the pEGFP-N1 vector (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). The TCR α (V α 12.1) full-length cDNA was ob-

tained by amplification from the TCR α -pCDNA3 plasmid (29) with the sense 5'-ATG GAT CCT CTA GAT GAT TTT TGC CAG CCT GTT G-3' and antisense 5'-GGG GGA TCC CCG CTG GAC CAC AGC CGC AG-3' primers and further cloning into the *Bam*HI site of pEGFP-N1 (Fig. 1A). The pT α^a , pT α^b , and TCR α cDNAs were also subcloned, as previously described (29), into the *Bam*HI site of the pcDNA3-derived bicistronic expression vector pCIGFP, which contains an internal ribosomal entry site (IRES) sequence, followed by the green fluorescent protein (GFP) cDNA (Fig. 1B). The human mature T cell line Jurkat (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA), the pre-T cell line SupT1 (ATCC), and the TCR α -deficient JR3.11 mutant (30), derived from Jurkat, were grown in RPMI 1640 medium (BioWhittaker, Walkersville, MD) supplemented with 10% FCS (Life Technologies, Paisley, U.K.). Transfections were conducted by electroporation, as previously described (15). Briefly, 50 μ g plasmid DNA were transfected at 264 V and 975 μ F in a Gene Pulser II (Bio-Rad, Richmond, CA). Transient transfectants were analyzed 14–24 h after electroporation. Stable transfectants were generated by G418 selection, as described (15). Cotransfections were performed by electroporation with a fixed amount (10 or 20 μ g) of pT α^a -GFP plasmid cDNA plus increasing amounts of either pT α^b -GFP plasmid cDNA or empty pCIGFP plasmid cDNA (29) as control, plus up to 70 μ g carrier pcDNA3 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) per transfection point. Then, 6–8 h later, electronically gated GFP⁺-transfected cells were examined for surface CD3 levels by flow cytometry. The percentage of CD3 expression per transfection point was determined from the mean fluorescence intensity values using the corresponding pCIGFP controls as reference.

Flow cytometry and activation assays

Directly PE-labeled anti-CD3 and unlabeled anti-CD3 mAbs were obtained from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), and PE-labeled anti-CD69 from Caltag Laboratories (Burlingame, CA). The 1734-14 anti-V β 8 mAb was a generous gift from A. Alcover (Institute Pasteur, Paris, France). PE-labeled anti-mouse Ig Ab was purchased from Caltag Laboratories. Staining and flow cytometric analysis were performed as described (15) in an Epics XL cytometer (Coulter, Hialeah, FL). Analysis of intracellular Ca²⁺ fluxes was conducted as previously reported (31). Briefly, 10⁷ cells/ml were loaded with fura 2-acetoxymethyl ester (Sigma, St. Louis, MO). Fluorometric responses were recorded in a PerkinElmer (Norwalk, CT) fluorometer after stimulation with 10 μ g/ml anti-CD3 OKT3 (ATCC) or anti-pT α K5G3 (see below) mAbs. CD69 expression was analyzed by flow cytometry after a 12-h incubation of cells in plates previously coated with 20 μ g/ml anti-CD3 OKT3 or in the presence of 20 ng/ml PMA (Sigma) plus 1 μ M ionophore (Sigma).

Generation of the anti-pT α K5G3 mAb

A cDNA encoding the extracellular region of the human pT α -chain was generated by amplification with the sense 5'-CCG GAT CCA TAT GCT ACC CAC AGG TGT GGG C-3' and antisense 5'-CCC CGG ATC CTCA CAG CGC CCC ACC CGG TGT-3' oligonucleotides. The amplification was digested with *Bam*HI and ligated into the *Bam*HI site of the isopropyl β -D-thiogalactoside-inducible, His-tag-containing pQE32 vector (Qiagen, Hilden, Germany). A 15-kDa recombinant protein was purified from transformed M15 *Escherichia coli* after isopropyl β -D-thiogalactoside induction under 8 M urea-denaturalizing conditions following manufacturer's instructions. A total of 50 μ g keyhole limpet hemocyanin-coupled Ag was used to immunize BALB/c mice *i.p.* in combination with CFA (Difco, Detroit, MI). Second and third immunizations were conducted 30 days later with 50 μ g Ag and incomplete Freund's adjuvant (Difco), and 50 days later with 70 μ g Ag alone, respectively. Lymph node cells from immunized mice were fused with the murine myeloma cell line Ag8653, according to standard procedures. Ag specificity of hybridoma supernatants was assessed by ELISA and confirmed by immunofluorescence staining of transfected COSA7 cells (not shown).

Confocal microscopy

JR3.11 transfectant lines were adhered to poly(L-Lys) (Sigma)-precoated coverslips (5 \times 10⁵ cells/coverslip) by incubation at 37°C for 2 h. Coverslips were then washed in PBS, fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 10 min, and blocked with 2% BSA/PBS. For intracellular staining, cells were permeabilized for 5 min with 0.05% Triton X-100 (Sigma) before blocking. Cells were stained by incubation for 30 min with 4 μ g/ml of either anti-protein disulfide isomerase (PDI) Ab (Stressgen, Victoria, Canada) or Leu-4 anti-CD3 ϵ mAb (BD Biosciences) plus E43 anti-CD59 mAb (generously provided by V. Horejsi, Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic). Secondary reagents include anti-rabbit Ig rhodamine (tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC); Southern Biotechnology,

Birmingham, AL), anti-mouse IgG1 TRITC, and anti-mouse Ig Cy5 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Preparations were viewed using a Radiance 2000 system (Bio-Rad) coupled to an Axiovert S100TV inverted microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Enhanced GFP (EGFP), TRITC, and Cy5 fluorescence were detected using bandpass filter HQ515/30, longpass filter HQ600/50, and longpass filter HQ660/LP, respectively.

Metabolic labeling and immunoprecipitation

Twenty-four hours after transfection, cells were washed twice in PBS and incubated for 30 min at 37°C in Met/Cys-free DMEM medium at 10⁷ cells/ml. Labeling was performed for 30 min by adding 300 μCi/ml of a combination of [³⁵S]Met/Cys (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). After an additional hour of incubation with 10% FCS-supplemented RPMI 1640 medium (BioWhittaker), cells were washed twice in PBS and lysed in 1% Brij 96 containing lysis buffer, as described (29). After preclearings with preimmune rabbit serum plus protein G-Sepharose beads (Amersham), lysates were immunoprecipitated with a rabbit anti-serum against the pTα cytoplasmic region (CT-1) (29) coupled to protein G-Sepharose beads. Immunoprecipitates were extensively washed with lysis buffer and resolved in two-dimensional SDS-PAGE.

Isolation of thymocyte samples

Postnatal thymocyte subsets were isolated from thymus samples removed during corrective cardiac surgery of patients aged 1 mo to 3 years, as previously described (24). Briefly, large- and small-sized thymocyte subsets were recovered from the 1.068 and 1.08 density layers, respectively, after centrifugation on stepwise Percoll density gradients (LKB, Uppsala, Sweden), and depletion of mature T, B, NK, and myeloid cells, as described (15). CD34⁺ and CD4⁺CD8⁺ cells were immunomagnetically sorted using anti-CD34- and anti-CD8-coated magnetic beads (Dynabeads; Dynal, Oslo, Norway), respectively. CD4⁺CD8⁺ were isolated from the CD8⁺ fraction with anti-CD4-coated beads (Dynal). Large DP CD3⁺ thymocytes were further fractionated into CD8α⁺ and CD8α⁺ cells by sorting in an EPICS Elite Cell Sorter (Coulter) after labeling with anti-CD8β (2ST8-5H7, kindly provided by E. L. Reinherz, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA) plus PE-labeled goat anti-mouse IgG2a (Caltag Laboratories).

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA from thymocyte subsets was isolated using standard procedures, as described (26), and reverse transcribed into cDNA following manufacturer's instructions (Life Technologies) using an oligo(dT) primer. A total of 10–50 ng retrotranscribed RNA was used per PCR reaction. The primers and TaqMan probes for RT-PCR were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). TaqMan probes were labeled with 6-carboxy fluorescein (Applied Biosystems). For pTα^a the sense 5'-GTG TCC AGC CCT ACC CAC-3' and antisense 5'-ATC CAC CAG CAG CAT GAT TG-3' primers were used in combination with the 5'-TGT GGG CGG CAC ACC CTT TC-3' TaqMan probe. pTα^b isoform was amplified separately using the sense 5'-GCC GGT ACA TGG CTG CTA CT-3' and antisense 5'-CTG TAG AAG CCT CTC CTG TG-3' primers together with the 5'-CCT GGC CCT TGG GTG TCC AGC-3' TaqMan probe. Primers and probes were used at a final concentration of 300 nM and 200 nM, respectively. GAPDH amplifications were conducted with the Pre-Developed TaqMan Assay Reagent specific for human GAPDH gene expression quantification (Applied Biosystems), according to manufacturer's indications. All PCR reactions were set in triplicates using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Amplifications, detection, and analysis were performed in an ABI PRISM 7700 system (Applied Biosystems).

Results

Impaired surface expression of human pTα^b as part of a functional pre-TCR complex

RT-PCR analysis of RNA isolated from unfractionated human thymocytes, using pTα-specific primers in exons 1 and 4, allowed us to amplify two different fragments, one of the expected size corresponding to pTα^a, and a smaller one lacking 320 bp (data not shown). Cloning and sequencing of the smaller PCR product confirmed that it corresponded to the previously described human pTα^b spliced isoform, which lacks exon 2 coding for most of the extracellular Ig-like domain (28). To gain some insights into the functional expression of a putative alternative pTα^b-containing pre-TCR complex, transfection experiments were conducted using

a TCRα-deficient human T cell line, JR3.11, derived from Jurkat, in which TCRα-chain transfection was shown to reconstitute surface expression of a functional CD3-associated TCRαβ heterodimer (30). To detect expression in transfected cells, pTα^a and pTα^b cDNAs were fused to GFP (Fig. 1A) and then they were

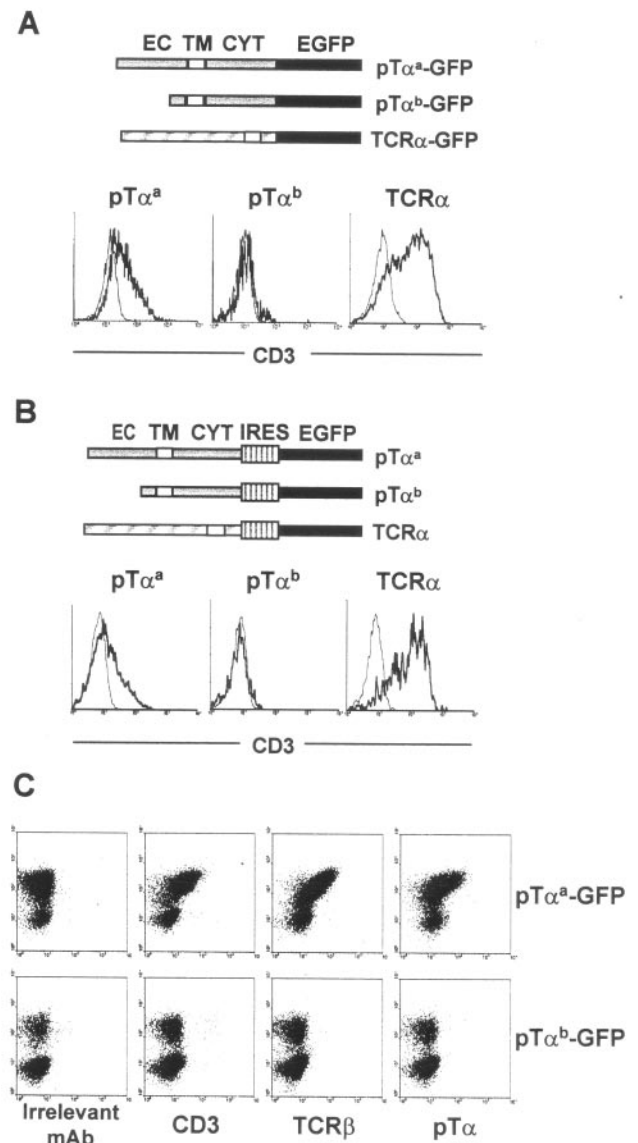


FIGURE 1. Pre-TCR surface expression is detected in pTα^a, but not pTα^b transfectants. *A*, Schematic representation of pTα^a-GFP, pTα^b-GFP, and TCRα-GFP constructs used in transfection experiments, and CD3 surface expression in pTα^a, pTα^b, and TCRα transient transfectants. EC, TM, and CYT stand for extracellular, transmembrane, and cytoplasmic regions, respectively. *B*, Schematic representation of bicistronic expression vectors containing pTα^a, pTα^b, or TCRα cDNAs, followed by an IRES sequence and the EGFP cDNA, and CD3 surface expression in pTα^a, pTα^b, and TCRα transient transfectants. JR3.11 cells were transfected with the constructs shown in *A* and *B* and analyzed 14–24 h later by flow cytometry after staining with Leu-4 PE anti-CD3 mAb. CD3 expression in GFP⁺ electronically gated cells (bold histograms) is overlaid for comparison with CD3 expression in GFP⁻ cells (thin histograms). *C*, Surface expression of pre-TCR components in representative pTα^a-GFP (a13.2) and pTα^b-GFP (b71.2) stable transfectant cell lines. Anti-CD3 (Leu-4 PE), anti-TCRβ (anti-Vβ8 mAb plus goat anti-mouse Ig PE), and anti-pTα (K5G3 mAb plus anti-mouse Ig PE) stainings vs GFP expression are shown. Results are representative of >30 different pTα^a and pTα^b stable transfectants, and 10 independent experiments.

independently transfected into JR3.11 cells for comparison. Expression of surface CD3 was analyzed 24 h later by flow cytometry on transfected JR3.11 cells traced by their GFP expression. As shown in Fig. 1A, CD3 was expressed on GFP⁺ pTα^a transfectants, but at very low levels, such as found on primary pre-T cells (15), while no CD3 was found on GFP⁻ cells. The situation was markedly different in pTα^b-GFP transfectants, as no CD3 expression could be detected on GFP⁺ cells (Fig. 1A). Therefore, our data indicate that, unlike pTα^a, transfection with pTα^b does not result in surface expression of a pre-TCR complex. To confirm that the different effects of pTα^a and pTα^b on pre-TCR expression were not due to the GFP tag, the experiments were repeated with non-tagged pTα isoforms, using the bicistronic expression vector pCIGFP containing either pTα^a or pTα^b, followed by an IRES sequence and the GFP cDNA (Fig. 1B). Again, surface CD3 expression was induced on GFP⁺ cells transfected with pTα^a, but not pTα^b. In addition, control transfection experiments using either a TCRα-GFP fusion construct or a bicistronic pCIGFP-TCRα construct revealed normal surface expression levels of a CD3-associated TCRαβ complex on GFP⁺, but not GFP⁻, transfectants (Fig. 1, A and B).

Our results were further confirmed in JR3.11 pTα^a-GFP and pTα^b-GFP stable transfectants. As shown in Fig. 1C, the heterogeneous expression of GFP within each transfectant cell line served to trace the specificity of surface CD3 expression by two-color flow cytometry. Again, pTα^a-GFP⁺ cells expressed CD3, but no CD3 expression was found on GFP⁺ cells from >30 pTα^b transfectant cell lines analyzed. Of notice, all pTα^a transfectants derived in this study (~35 independent cell lines) displayed low levels of CD3, similar to those found on transient transfectants. More importantly, surface labeling with an anti-Vβ8 mAb revealed that such GFP⁺ pTα^a, but not pTα^b, transfectants coexpressed CD3 and the endogenous TCRβ chain in stoichiometric amounts (Fig. 1C), suggesting that CD3 and TCRβ were expressed on pTα^a transfectants as part of a conventional pTα^a-TCRβ pre-TCR complex.

To seek direct evidence that pTα^a was in fact expressed together with CD3 and TCRβ, different pTα^a-GFP transfectant cell lines were then assayed for their reactivity with a mAb (K5G3) that was produced against the extracellular region of the human pTα chain, as described in *Materials and Methods*. Immunofluorescence microscopy of COS transfectants provided evidence of the specificity of the anti-pTα reagent, as it was reactive against all GFP⁺ COS cells transfected with pTα^a-GFP, but not against pTα^b-GFP transfectants (data not shown). As shown in Fig. 1C, flow cytometric analyses revealed that surface reactivity with K5G3 was exclusively detected in pTα^a-GFP⁺ (but not in pTα^b-GFP⁺) stable transfectants. These results provide formal proof that surface expression of all TCRβ, pTα^a, and CD3 pre-TCR components is specifically induced after transfection with pTα^a. Taken together, these data support the notion that, in contrast to mouse, human pTα^a is unique, or at least more efficient than pTα^b, in bringing TCRβ to the cell surface as part of a CD3-associated pre-TCR complex.

Still, it was possible that an alternative pTα^b-containing pre-TCR could be expressed at the cell surface, although at levels below the detection limit of the flow cytometry technique. To rule out this possibility, more sensitive assays were performed that allow detection of surface expression of a functional pre-TCR. First, intracytosolic Ca²⁺ increases were analyzed in distinct pTα^a and pTα^b stable transfectants after CD3/pre-TCR engaging with mAbs against distinct surface epitopes. As shown in Fig. 2A, no Ca²⁺ fluxes were recorded in a representative pTα^b transfectant in response to CD3 stimulation. In contrast, pTα^a transfectants were all

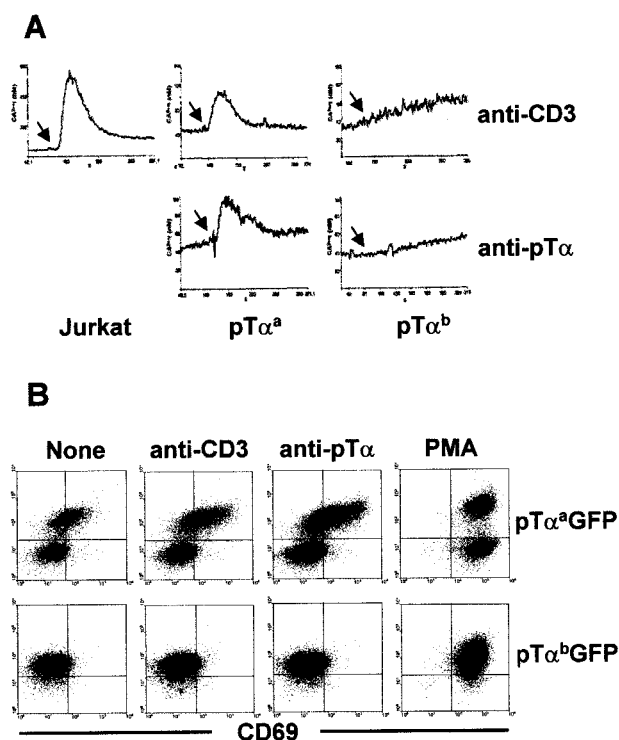


FIGURE 2. pTα^a, but not pTα^b, can promote surface expression of a signaling-competent pre-TCR. **A**, Analysis of intracellular Ca²⁺ increases in pTα^a and pTα^b transfectants after stimulation. Jurkat, pTα^a-GFP (a10.4), and pTα^b-GFP (b1.4) cell lines were loaded with fura 2-acetoxymethyl ester, stimulated with anti-CD3 (OKT3) and anti-pTα (K5G3) mAbs, and fluorometrically measured for Ca²⁺ mobilization. **B**, Analysis of CD69 expression after stimulation of pTα^a and pTα^b transfectants. pTα^a and pTα^b cell lines were stimulated with either anti-CD3 mAb, anti-pTα mAb, or PMA for 12 h and analyzed for CD69 expression by flow cytometry. CD69-PE vs GFP dot plots are shown. Results are representative of five different experiments and four distinct pTα^a and pTα^b stable transfectants.

responsive to CD3 ligation, although Ca²⁺ signals were consistently lower than those induced in the parental Jurkat cells upon stimulation of the mature CD3-TCRαβ. Importantly, Ca²⁺ mobilization was also induced by specific pTα^a ligation with K5G3 mAb, further supporting surface expression of a functional pre-TCR.

Induction of CD69 was finally analyzed as an additional indicator of cellular activation upon pre-TCR ligation (3). As shown in Fig. 2B, up-regulation of CD69 was invariably induced by both anti-CD3 and anti-pTα^a mAbs in GFP⁺ pTα^a transfectants, whereas levels of CD69 remained unchanged in GFP⁺ pTα^b transfectants treated with anti-CD3. Expectedly, no changes in CD69 expression were observed after treatment of pTα^b transfectants with the K5G3 mAb, included in the study as control of anti-pTα^a specificity. As activation with PMA induced high CD69 surface levels on both transfectants regardless of GFP expression, we can conclude that JR3.11 cells transfected with pTα^b retain their intrinsic ability to express CD69, but lack expression of a pre-TCR complex that triggers the appropriate intracellular activation signals from the cell surface. As a whole, phenotypic and functional approaches provide evidence that human pTα^b is unable to be expressed on the cell surface as part of a functional CD3-associated pre-TCR, while pTα^a brings TCRβ to the cell surface as part of a functional pre-TCR.

pT α^b retains the TCR β chain intracellularly

To determine the subcellular localization of the chimeric pT α^b -GFP protein, several stable pT α^b -GFP transfectants were analyzed by confocal microscopy and compared with pT α^a -GFP transfectants. Green fluorescence examination of permeabilized cells (Fig. 3A) revealed that GFP was mostly found scattered throughout the cytosol in both pT α transfectants (*left panels*), indicating that both pT α^a and pT α^b isoforms were preferentially located intracellularly, most likely in the ER. This possibility was confirmed after staining with an Ab recognizing the protein disulfide isomerase ER-resident protein. Most of the pT α^a -GFP and pT α^b -GFP chimeric proteins displayed a localization pattern similar to PDI staining (*middle panels*). Overlay analysis (*right panels*) showed that both proteins do in fact colocalize, and therefore, that the vast majority of both pT α^a and pT α^b chains remains retained within the ER in transfected cell lines.

As shown in Fig. 3B, surface staining with an anti-CD3 mAb further confirmed the above results in that pT α^a , but not pT α^b transfectants showed CD3 expression on the membrane (Fig. 3B, *left panels*). Interestingly, CD3 expression on pT α^a transfectants displayed an uneven distribution in one or more patches around the cell that colocalized with GFP expression (*middle-left panels*). As this pattern could suggest a preferential recruitment of pre-TCR complexes into membrane activation microdomains (lipid rafts), staining with a mAb against a lipid raft-resident protein such as the GPI-anchored CD59 molecule (32) was performed in pT α^a and pT α^b cell lines. As shown in the CD3/CD59 and GFP/CD3/CD59 overlays on the *right*, CD59 remains interspersed with a typical raft-associated expression pattern in pT α^b -expressing and is clus-

tered in big patches in pT α^a transfectants. Importantly, CD59 co-localizes with CD3 expression in pT α^a cells, suggesting that pT α^a -containing pre-TCR complexes can be spontaneously recruited into lipid rafts in our transfectant cell lines.

To next investigate whether impaired surface expression of pT α^b was due to a defective association to TCR β , pT α^a and pT α^b transient transfectants were metabolically labeled with [35 S]methionine, and their lysates immunoprecipitated with a rabbit antiserum (CT-1) raised against a synthetic peptide contained in the cytoplasmic region of the human pT α molecule, and hence shared by both pT α isoforms (29), and resolved in two-dimensional gels. As expected, the CT-1 antiserum immunoprecipitated a pT α^a -TCR β dimer from pT α^a transfectants that migrated out of the diagonal (Fig. 4, *left*). More importantly, pT α^b -TCR β dimers were also reduced from pT α^b precipitates (Fig. 4, *right*), showing that the hampered expression of a pT α^b -containing pre-TCR on the cell surface is not due to a deficient association of TCR β .

The observation that pT α^b can associate with TCR β in the cytoplasm prompted us to analyze whether impaired surface expression of a pT α^b -containing pre-TCR may reflect a direct role for pT α^b in regulating levels of TCR β that can reach the cell surface. Transfection experiments were thus performed into SupT1 human pre-T cells, which lack TCR α , but not TCR β , retain expression of pT α mRNA, and display low CD3 surface levels representative of endogenous pre-TCR expression (15, 29). As shown in Fig. 5A, a moderate increase in CD3 surface expression was observed in SupT1 GFP $^+$ cells when pT α^a was overexpressed by transient transfection of a pT α^a -GFP chimeric construct (Fig. 5A, *upper left histogram*). In contrast, when the pT α^b -GFP isoform was transfected instead, CD3 expression was down-regulated in GFP $^+$ -transfected cells, compared with GFP $^-$ -untransfected cells (Fig. 5A, *upper right histogram*). Similarly, transfection of SupT1 cells with the pCIGFP bicistronic vector containing untagged pT α^a cDNA induced a moderate, but measurable up-regulation of CD3 expression, whereas pCIGFP-pT α^b transfection consistently resulted in down-regulated expression of CD3 (Fig. 5A, *lower histograms*). Therefore, our data indicate that lack of pT α^b expression on the surface is not due to impaired association with TCR β , but rather that pT α^b can bind and retain the TCR β chain intracellularly. Moreover, they suggest that the pT α^b splice variant may compete with pT α^a for its association with TCR β and/or CD3, thus regulating surface levels of expression of the pre-TCR.

To determine how effectively pT α^b could compete with pT α^a for intracellular retention of TCR β , we next analyzed comparative levels of surface CD3/pre-TCR expressed on the TCR α -deficient JR3.11 cell line upon transfection with a fixed amount of pT α^a -

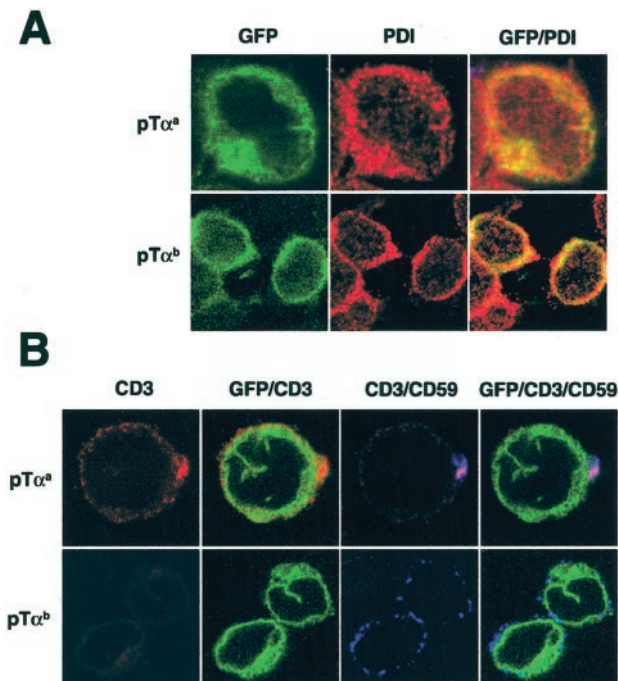


FIGURE 3. Confocal microscopy analysis of pT α^a -GFP and pT α^b -GFP stable transfectants. pT α^a -GFP (a13.2) and pT α^b -GFP (b1.4) transfectants were adhered to coverslips and fixed, as described in *Materials and Methods*. *A*, Permeabilized cells were stained with anti-PDI Ab plus goat anti-rabbit Ig TRITC. Representative GFP, PDI, and overlaid GFP/PDI expression images are shown for both pT α^a and pT α^b transfectants. *B*, Nonpermeabilized cells were stained with anti-CD3 (Leu-4) mAb plus goat anti-mouse IgG1 TRITC and anti-CD59 (E43) mAb plus goat anti-mouse Ig Cy5. Representative images for CD3, and overlaid GFP/CD3, CD3/CD59, and GFP/CD3/CD59 expression patterns are shown.

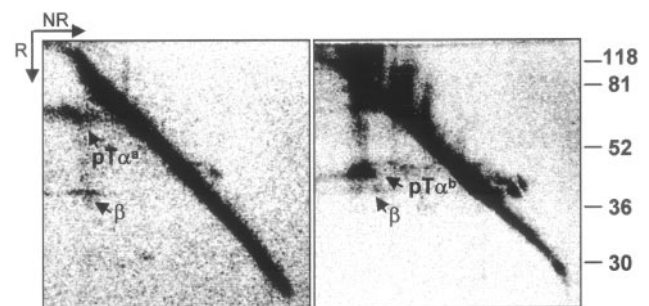


FIGURE 4. The pT α^b isoform retains the TCR β chain intracellularly. JR3.11 cells transiently transfected with either pT α^a -GFP (*left*) or pT α^b -GFP (*right*) constructs were metabolically labeled, immunoprecipitated with an anti-pT α (CT) rabbit antiserum, and resolved by two-dimensional (nonreducing (NR)/reducing (R)) SDS-PAGE. Molecular mass markers in kilodaltons are shown on the *right*.

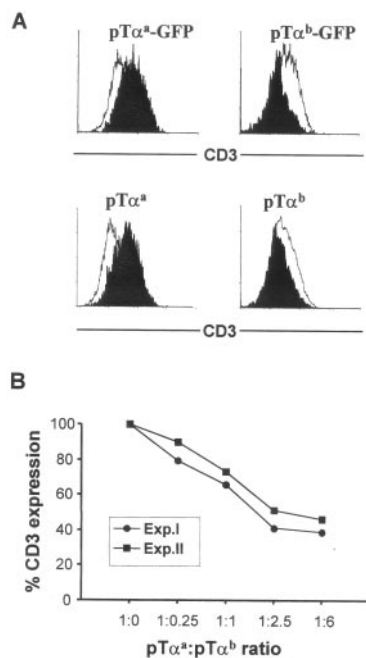


FIGURE 5. The pTα^b isoform is able to reduce surface pre-TCR expression levels induced on pTα^a transfectants. *A*, CD3 surface expression on SupT1 pre-T cells transiently transfected with pTα^a-GFP or pTα^b-GFP constructs (*upper histograms*), or with a bicistronic vector encoding untagged pTα^a or pTα^b isoforms plus EGFP. Twenty-four hours after transfection, cells were stained with Leu-4 PE anti-CD3 mAb and analyzed by flow cytometry. CD3 expression in GFP⁻ untransfected cells (unshaded histograms) and GFP⁺-transfected cells (shaded histograms) is shown. *B*, Surface CD3 expression levels induced on TCRα-deficient JR3.11 cells transfected with pTα^a are reduced in a dose-dependent manner upon cotransfection with pTα^b. Electronically gated GFP⁺ JR3.11 cells cotransfected with a fixed amount of pTα^a-GFP cDNA, plus increasing amounts of either pTα^b-GFP cDNA or empty pCIGFP plasmid as control, were examined for surface CD3 levels 8 h after transfection, as described in *A*. Expression changes were recorded as the percentage of anti-CD3 mAb binding (estimated as mean fluorescence intensity (MFI)) in samples cotransfected with pTα^a and pTα^b, relative to the corresponding negative controls cotransfected with pTα^a and empty pCIGFP. Data from two representative independent experiments are shown.

GFP cDNA, plus increasing amounts of either pTα^b-GFP cDNA or empty pCIGFP plasmid as control. We found that surface CD3 expression levels induced on GFP⁺ cells transfected with pTα^a were invariably reduced in a dose-dependent manner in GFP⁺ cells cotransfected with pTα^b. As shown in Fig. 5*B*, surface CD3 expression levels were reduced to 60% on cells cotransfected with equal amounts of both pTα cDNA isoforms (1:1 ratio), and dropped to 40% upon cotransfection at a 1:2.5 pTα^a/pTα^b cDNA ratio. Therefore, pTα^b seems to compete efficiently with and to displace pTα^a for its association with TCRβ and/or CD3, this resulting in reduced surface expression of the pre-TCR.

Independent regulation of pTα^a and pTα^b expression during human intrathymic development

To seek a possible developmental role for pTα^b in vivo, we aimed at establishing the expression patterns of both pTα^a and pTα^b isoforms during human intrathymic development. This issue was approached by real-time quantitative PCR, which provides a unique means to quantify transcription accurately, because detection of the amplified product proceeds along the whole reaction, by using a combined thermocycler detector system. This allows performance of the quantification from the earliest phases of amplifica-

tion, when the amount of product is proportional to the starting target DNA quantity. Primers and TaqMan probes were designed to independently amplify and detect pTα^a and pTα^b in different thymus subsets. The primer-probe combinations for both isoforms are represented schematically in Fig. 6*A*. Primers for pTα^b amplification were designed in the first exon and in the junction between exons 1 and 3, respectively. The TaqMan probe for pTα^b annealed with the first exon. As the specificity of this amplicon relied on only in the exon 1-to-exon 3 junction, which is partially conserved among splice sites, different 3' primers had to be tested to fulfill the required specificity. The specificity of the chosen pair is depicted in Fig. 6*B*, which shows that amplification of a plasmid containing pTα^b cDNA was detected from very early cycles of the reaction. On the contrary, when a pTα^a-containing plasmid was used as template, amplification curves overlaid with the control reactions where no template was added. This result ensured that pTα^a would not be cross-detected with the pTα^b primers in the thymus samples. Specificity of the pTα^a primers and probe was tested as well (not shown).

Quantification of the test samples was performed by interpolation of their threshold cycle (Ct) values (i.e., the cycle at which the fluorescence of the reaction first arises above the background) into a standard curve that was created by amplification of a serially (10-fold) diluted template covering a range of concentration of 10⁴. The correlation coefficients obtained in different standard curves using cDNA from human thymus as template varied between 0.98 and 1 (data not shown). Sample-to-sample variations were corrected by normalization to GAPDH expression, used as endogenous control. Therefore, cDNA samples from thymic subsets were amplified in parallel for GAPDH, pTα^a, and pTα^b, and quantitative values were obtained by interpolation in standard curves of total thymus cDNA. Final quantitative data were the result of calculating pTα^a/GAPDH and pTα^b/GAPDH ratios for each sample.

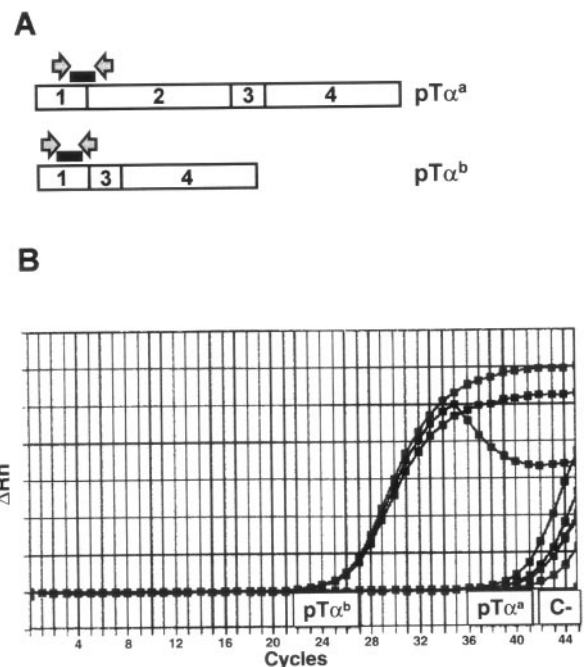


FIGURE 6. Specificity of pTα^b detection by quantitative RT-PCR. *A*, Design of pTα^a and pTα^b amplicons. Arrows, Primers; ■, TaqMan probes. Exon composition is also depicted. *B*, pTα^b primers and TaqMan probe were used to amplify pTα^b and pTα^a plasmid templates. PCR reactions were performed in triplicates. No-template amplification curves are shown as a negative control. ΔRn, change in normalized reporter signal.

cDNA was synthesized from RNA obtained from thymic subsets representing different developmental stages, and subjected to amplification. The results obtained for one representative experiment covering all thymocyte subsets from the very same individual are represented in Fig. 7A. It was found that the most immature $CD34^+CD4^-$ thymocytes display moderate levels of $pT\alpha^a$ expression, which are increased to maximal levels in the downstream $CD4^+CD8^-CD3^-$ pre-T cell stage. Such a high transcriptional rate is maintained in $CD4^+CD8\alpha^+$ cells, immediately preceding the β -selection checkpoint (24). However, $pT\alpha^a$ transcription

drops abruptly after this critical step, such that $pT\alpha^a$ mRNA levels are ~ 10 -fold reduced in both cycling (large) and resting (small) $CD4^+CD8\alpha\beta^+$ thymocytes, when functional expression of the pre-TCR has already taken place (24), but before $TCR\alpha\beta$ expression. A distinct transcription pattern was observed for $pT\alpha^b$. Up-regulation of $pT\alpha^b$ transcription is developmentally delayed as compared with $pT\alpha^a$, such that $pT\alpha^b$ expression levels are increased first at the $CD34^+CD4^-$ to $CD4^+CD8^-$ transition, but peak at the next $CD4^+CD8\alpha^+$ stage, immediately upstream of β -selection (Fig. 7A, upper graph). Transcription level of $pT\alpha^b$ decreases afterward, although somewhat less dramatically than $pT\alpha^a$, in β -selected $CD4^+CD8\alpha\beta^+$ thymocytes. As a consequence of this apparently independent regulation of $pT\alpha^a$ and $pT\alpha^b$ expression, $pT\alpha^b:pT\alpha^a$ ratio increases along intrathymic development, indicating a relative accumulation of $pT\alpha^b$ isoform at later pre-T cell stages (Fig. 7A, lower graph). This relative increase of $pT\alpha^b:pT\alpha^a$ ratio in β -selected vs β -unselected ($CD4^+CD8^-$) thymocytes is shown in Table I for four independent experiments.

Down-modulation of both $pT\alpha$ isoforms, and more dramatically of $pT\alpha^a$, immediately following β -selection led us to think that there could be a functional link between both events, such that cellular activation associated to β -selection may trigger quantitatively different responses regarding down-regulation of $pT\alpha^a$ and $pT\alpha^b$ mRNAs. To approach this possibility, we took advantage of the fact that both isoforms are constitutively expressed in the pre-T cell line SupT1, and evaluated whether cellular activation could induce quantitative changes in their mRNA levels (Fig. 7B). Up-regulation of CD69 was used as a phenotypic criteria of activation (left). Quantitative RT-PCR data shown in Fig. 7B (right) indicate that cellular activation induced by treatment with PMA plus calcium ionophore results in a significant reduction of $pT\alpha^a$ mRNA. In contrast, $pT\alpha^b$ mRNA is only subtly reduced in activated cells, suggesting that $pT\alpha^a$ is more sensitive than $pT\alpha^b$ to transcriptional down-regulation induced upon cellular activation.

Discussion

In both mice and humans, a second, alternatively spliced, mRNA isoform of $pT\alpha$, $pT\alpha^b$, has been described, whose developmental relevance remains unknown. The aim of the present study has been to approach this issue in the human system. By focusing on the biochemical properties and regulation of expression of $pT\alpha^b$ in vivo, we show in this study that, in contrast to $pT\alpha^a$, $pT\alpha^b$ is unable to promote the expression of a human pre-TCR complex on the surface of transfected cells, but retains the ability to bind to $TCR\beta$ intracellularly. Moreover, both isoforms are shown to display a different pattern of mRNA expression along human intrathymic development, which provides evidence of their independent regulation in vivo, and supports their individual roles during the T cell developmental process.

Experimental evidence for the different capacities of $pT\alpha$ isoforms to regulate surface $TCR\beta$ expression was originally provided by Barber and coworkers (27) in mice. However, the murine

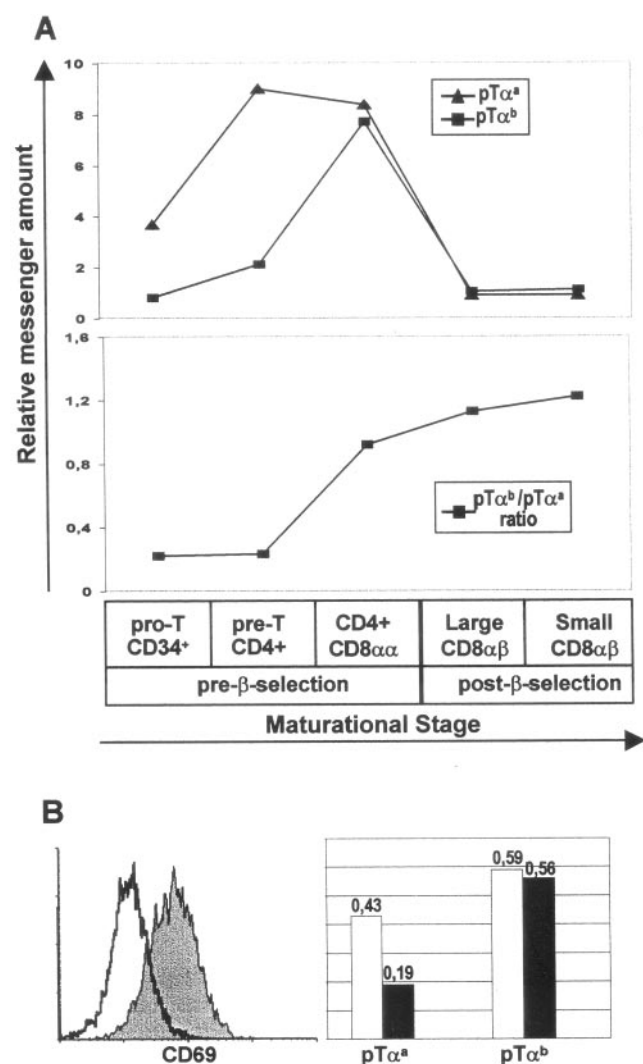


FIGURE 7. Differential regulation of $pT\alpha^a$ and $pT\alpha^b$ isoforms during human intrathymic development. **A**, Intrathymic subsets representing sequential maturational stages were isolated, as described in *Materials and Methods*, and subset identification is depicted at the bottom. RNAs were isolated, reverse transcribed, and subjected to quantitative RT-PCR. $pT\alpha^a$, $pT\alpha^b$ (see Fig. 6A), and GAPDH-specific amplifications were conducted in parallel in triplicate reactions for each of the cDNA samples. *Top*, $pT\alpha^a$ and $pT\alpha^b$ values were obtained after normalization to GAPDH values. *Bottom*, $pT\alpha^b:pT\alpha^a$ ratio. Relative transcriptional amounts are given in arbitrary units. **B**, Susceptibility of $pT\alpha^a$ and $pT\alpha^b$ mRNAs to cellular activation. SupT1 pre-T cells were activated by treatment with PMA plus ionophore. Activation was assessed by staining with anti-CD69 PE Ab and flow cytometry analysis. Histograms on the left show CD69 expression on SupT1 cells before (unshaded histogram) and after treatment (shaded histogram). Expression of $pT\alpha^a$ and $pT\alpha^b$ mRNAs measured by quantitative RT-PCR before (□) and after (■) SupT1 activation is shown on the right for a representative experiment.

Table I. $pT\alpha^b/pT\alpha^a$ transcriptional ratio in pre- β -selected vs post- β -selected thymocytes in four independent experiments^a

	Pre- β -Selection	Post- β -Selection	Post- β -Selection/Pre- β -Selection Rate
1	1.12	7.11	6.3
2	0.40	2.20	4.6
3	1.25	3.62	2.9
4	0.23	1.13	4.9

^a Pre- β -selected and post- β -selected thymocytes were isolated as $CD4^+CD8\alpha\beta^-$ and $CD4^+CD8\alpha\beta^+$ cells, respectively, from $TCR\alpha\beta^-$ thymocytes.

pT α isoforms were shown to behave differently from the human isoforms. Indeed, in contrast to its human counterpart, the murine pT α^b isoform was proposed to be more efficient than pT α^a in bringing a pre-TCR to the cell surface. This proposal was based on the finding that pT α^a , but not pT α^b , was capable of reducing surface levels of a transfected TCR β chain on a TCR-deficient T cell line. Although species-specific functional differences cannot be ruled out, it is also likely that discrepancies between mice and humans rely on the particular experimental systems used. In this regard, it is worth noting that Barber and coworkers (27) showed that transfection of TCR-deficient murine cells with TCR β alone resulted in measurable levels of surface TCR β , which was thus expressed independently of pT α ; however, surface expression pT α or CD3 was difficult to detect upon cotransfection with pT α^a or pT α^b isoforms. The situation was markedly different in the TCR α -deficient human T cell line JR3.11 used in this study, since no surface TCR β expression occurred in the absence of a TCR β -pairing subunit. Therefore, we could directly assess the contribution of pT α^a and pT α^b isoforms in bringing the endogenous TCR β chain to the cell surface.

Transfection of JR3.11 cells with pT α^a and pT α^b , either untagged or tagged to GFP, has yielded important clues on the differential expression, biochemical properties, and possible functions of both isoforms in humans. In the first place, GFP tracing of transfected cells, together with the availability of appropriate specific reagents against individual pre-TCR components, has allowed us to conclude that pT α^a , but not pT α^b , is able to support surface expression of a CD3-associated TCR β -pT α heterodimer proved to be fully functional in terms of CD69 induction and Ca²⁺ mobilization. This is a somehow unexpected result regarding previous experimental arguments on the requirement of an additional surrogate VpreT chain, whose identification has remained elusive as yet, to promote pre-TCR expression on the membrane (5). Therefore, our findings indicate that, unless expressed on the mature JR3.11 line, the hypothetical VpreT chain either does not exist in humans, or is not absolutely required for the assembly and expression of a surface pre-TCR.

In addition to phenotypic and functional data, confocal microscopy examination confirmed the expression of a surface CD3-associated complex in pT α^a , but not in pT α^b transfectants, and also revealed that, in line with previous reports (1, 12, 15, 33), extremely low pre-TCR levels are able to reach the plasma membrane of our pT α^a transfectants regardless of the amount of protein found in the cytoplasm, as traced by GFP expression (data not shown). Interestingly, such low surface pre-TCR expression levels displayed a raft-associated distribution that closely resembles that recently reported for murine pre-T cells (23), and further reinforces the idea that the pre-TCR is spontaneously recruited into rafts and reaches the plasma membrane as a constitutively active complex also in humans. This in turn has been related to the apparently dispensable (or nonexistent) pre-TCR ligand (22, 23). More interestingly, this analysis showed that, regardless of their differential surface expression patterns, both pT α^a and pT α^b human isoforms, similarly to their murine counterparts (27), are predominantly found in the ER within the cell. This fact may reflect the existence of specific retention mechanisms that, as proposed recently (29), could map within the pT α cytoplasmic domain shared by both pT α isoforms.

The absence of pre-TCR complexes from the surface of our pT α^b transfectants raised the possibility that, despite retaining the cysteine residue involved in TCR β binding, pT α^b was unable to form dimers with the TCR β chain and, hence, could not promote the expression of a pre-TCR complex on the cell surface. However, we provide evidence that this is not the case, as TCR β -pT α^b

dimers could be precipitated from the cytoplasm of transfected cells. Therefore, other reasons must account for the impaired expression of pT α^b -containing complexes on the plasma membrane. One attractive possibility is that one or more CD3 chains may be displaced or absent from such pT α^b complexes, therefore preventing their release from the ER and their transport to the cell surface. Experiments are currently in progress to determine the exact composition of the cytoplasmic pT α^b -TCR β heterodimer in terms of CD3 association, and preliminary results suggest that CD3 γ can associate with the pT α^a -TCR β , but not with the pT α^b -TCR β heterodimer (unpublished results). Regardless of structural constraints, our finding that overexpression of pT α^b inhibits or reduces the expression of endogenous pre-TCR from the surface of SupT1 pre-T cells could suggest a possible competitive or regulatory role for pT α^b , which may be unable to reach the plasma membrane, but instead is capable of binding and retaining TCR β and/or CD3 chains intracellularly. This possibility was further supported by the finding that surface pre-TCR expression levels induced on TCR α -deficient JR3.11 cells transfected with pT α^a can be reduced in a dose-dependent manner upon cotransfection with pT α^b .

Although data regarding the regulation or stability of the pT α^b protein *in vivo* are still lacking, our observation that, as in mice (27), pT α^a mRNA is on average about 10-fold more abundant than pT α^b in the whole thymocyte population in humans (unpublished results) may argue against a competitive role for pT α^b in thymic differentiation. However, as pT α^b expression is expected to be time and stage specific in developmental terms, no definitive conclusions on its role could be drawn based on quantitative data obtained from total thymus samples. With this view in mind, we sought a possible function for pT α^b by studying its expression throughout T cell development. In this respect, quantitative RT-PCR has allowed us to compare accurately the shifts in pT α^a and pT α^b expression from small intrathymic subsets representative of independent maturation stages. This analysis has revealed that while transcription of both pT α isoforms is maximal at the β selection checkpoint, pT α^b peak of expression is delayed with respect to pT α^a and consistently decreases less dramatically (about 5-fold on average) than pT α^a following β selection, which together entails an increasing pT α^b :pT α^a ratio during intrathymic development. On the one hand, this differential transcriptional pattern supports that expression of both isoforms (either at the mRNA processing itself or at the stability level) is tightly controlled throughout T cell development, most likely reflecting functional differences between them. A similar finding has been reported for the alternatively spliced products of Pax-5 during B cell development (34). On the other hand, our data suggest that pT α^b function may be restricted to a narrow developmental window either coincident or immediately following TCR β chain expression and β selection. Finally, although previous data indicate that anti-CD3-induced pre-TCR signaling could silence the pT α locus (35), this is the first demonstration that normal *ex vivo* cells have lost expression of both pT α^a as well as pT α^b following β selection. As β selection simultaneously results in transcriptional activation of the TCR α locus, as measured by TEA transcription (3, 26), such a transcriptional regulatory mechanism would, in turn, limit developmental expression of the pre-TCR to stages preceding TCR α chain expression. Therefore, competitive displacement of pT α by TCR α during TCR assembly, although proved functionally relevant *in vitro* in mice (36), does not seem to be required to control surface pre-TCR expression *in vivo* in humans. According to this view, both pre-TCR and mature TCR $\alpha\beta$ can be coexpressed on SupT1 transfectants (29). This proposal concurs with our finding that pT α^a transcription drops abruptly in pre-T cells lacking TCR α immediately following PMA-induced activation. In addition, pT α^b

is only slightly reduced under such experimental conditions, most likely reflecting the relative increase of pT α^b transcripts observed in β -selected cells *in vivo*.

Although definitive conclusions on the physiological relevance of the relative pT α^b transcriptional increase observed in β -selected pre-T cells demand protein expression analysis at the single cell level, our data are compatible with a competitive function for pT α^b in thymocyte differentiation responsible for limiting or regulating surface expression of the TCR β -pT α^a pre-TCR following β -selection, but before TCR α expression. In addition, there still remains the possibility that pT α^b plays an independent signaling function from a subcellular compartment. It is currently assumed that the pre-TCR has to exit the ER to trigger β selection (20). However, as it has been discussed elsewhere (33), folding constraints could at least in part be responsible for that effect and, therefore, signaling from a post-ER compartment could also be considered. While rigorous testing of this attractive possibility awaits functional approaches such as those recently reported in mice (37), it seems reasonable to think that access to the surface could be dispensable provided that a competent complex is formed inside the cell, as could be the case for human pT α^b .

Acknowledgments

We thank Drs. A. Alcover, V. Horejsi, and E. L. Reinherz for the generous gift of Abs; Drs. C. Hernández and M. Viribay for invaluable help with quantitative RT-PCR; Drs. R. Bragado, P. Fuentes, and E. Teixeira for technical advice on functional assays; Dr. C. Sánchez for advice on confocal microscopy; and Drs. B. Alarcón, J. Millán and J. M. Redondo for helpful discussions.

References

- Borst, J., H. Jacobs, and G. Brouns. 1996. Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 8:181.
- Von Boehmer, H. 1994. Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76:219.
- Levelt, C. N., B. Wang, A. Ehrfeld, C. Terhorst, and K. Eichmann. 1995. Regulation of T cell receptor (TCR)- β locus allelic exclusion and initiation of TCR- α locus rearrangement in immature thymocytes by signaling through the CD3 complex. *Eur. J. Immunol.* 25:1257.
- Groettrup, M., K. Ungewiss, O. Azogui, R. Palacios, M. J. Owen, A. C. Hayday, and H. von Boehmer. 1993. A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor β chain and a 33 kd glycoprotein. *Cell* 75:283.
- Saint-Ruf, C., K. Ungewiss, M. Groettrup, L. Bruno, H. J. Fehling, and H. von Boehmer. 1994. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266:1208.
- Van Oers, N. S., H. von Boehmer, and A. Weiss. 1995. The pre-T cell receptor (TCR) complex is functionally coupled to the TCR- ζ subunit. *J. Exp. Med.* 182:1585.
- Berger, M. A., V. Dave, M. R. Rhodes, G. C. Bosma, M. J. Bosma, D. J. Kappes, and D. L. Wiest. 1997. Subunit composition of pre-T cell receptor complexes expressed by primary thymocytes: CD3 δ is physically associated but not functionally required. *J. Exp. Med.* 186:1461.
- Dudley, E. C., H. T. Petrie, L. M. Shah, M. J. Owen, and A. C. Hayday. 1994. T cell receptor β chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1:83.
- Hoffman, E. S., L. Passoni, T. Crompton, T. M. Leu, D. G. Schatz, A. Koff, M. J. Owen, and A. C. Hayday. 1996. Productive T-cell receptor β -chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development *in vivo*. *Genes Dev.* 10:948.
- Aifantis, I., J. Buer, H. von Boehmer, and O. Azogui. 1997. Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor β locus. *Immunity* 7:601.
- Haks, M. C., P. Krimpenfort, J. H. van den Brakel, and A. M. Kruisbeek. 1999. Pre-TCR signaling and inactivation of p53 induces crucial cell survival pathways in pre-T cells. *Immunity* 11:91.
- Kruisbeek, A. M., M. C. Haks, M. Carleton, D. L. Wiest, A. M. Michie, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2000. Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions. *Immunol. Today* 21:637.
- Von Boehmer, H., I. Aifantis, J. Fehling, O. Lechner, C. Saint-Ruf, U. Walter, J. Buer, and O. Azogui. 1999. Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 11:135.
- Petrie, H. T., F. Livak, D. G. Schatz, A. Strasser, I. N. Crispe, and K. Shortman. 1993. Multiple rearrangements in T cell receptor α chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J. Exp. Med.* 178:615.
- Trigueros, C., A. R. Ramiro, Y. R. Carrasco, V. G. de Yébenes, J. P. Albar, and M. L. Toribio. 1998. Identification of a late stage of small noncycling pT α^+ pre-T cells as immediate precursors of T cell receptor $\alpha\beta^+$ thymocytes. *J. Exp. Med.* 188:1401.
- Malissen, B., L. Ardouin, S. Y. Lin, A. Gillet, and M. Malissen. 1999. Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv. Immunol.* 72:103.
- Fehling, H. J., and H. von Boehmer. 1997. Early $\alpha\beta$ T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr. Opin. Immunol.* 9:263.
- Haks, M. C., M. A. Oosterwegel, B. Blom, H. M. Spits, and A. M. Kruisbeek. 1999. Cell-fate decisions in early T cell development: regulation by cytokine receptors and the pre-TCR. *Semin. Immunol.* 11:23.
- Godfrey, D. L., J. Kennedy, P. Mombaerts, S. Tonegawa, and A. Zlotnik. 1994. Onset of TCR- β gene rearrangement and role of TCR- β expression during CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ thymocyte differentiation. *J. Immunol.* 152:4783.
- O'Shea, C. C., A. P. Thornell, I. R. Rosewell, B. Hayes, and M. J. Owen. 1997. Exit of the pre-TCR from the ER/cis-Golgi is necessary for signaling differentiation, proliferation, and allelic exclusion in immature thymocytes. *Immunity* 7:591.
- Jacobs, H., J. Iacomini, M. van de Ven, V. S. Tonegawa, and A. Berns. 1996. Domains of the TCR β -chain required for early thymocyte development. *J. Exp. Med.* 184:1833.
- Irving, B. A., F. W. Alt, and N. Killeen. 1998. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280:905.
- Saint-Ruf, C., M. Panigada, O. Azogui, P. Debey, H. von Boehmer, and F. Grassi. 2000. Different initiation of pre-TCR and $\gamma\delta$ TCR signalling. *Nature* 406:524.
- Carrasco, Y. R., C. Trigueros, A. R. Ramiro, V. G. de Yébenes, and M. L. Toribio. 1999. β -Selection is associated with the onset of CD8 β chain expression on CD4 $^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ pre-T cells during human intrathymic development. *Blood* 94:3491.
- Blom, B., M. C. Verschuren, M. H. Heemskerk, A. Q. Bakker, E. J. van Gastel-Mol, I. L. Wolvers-Tettero, J. J. van Dongen, and H. Spits. 1999. TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* 93:3033.
- Ramiro, A. R., C. Trigueros, C. Marquez, J. L. San Millan, and M. L. Toribio. 1996. Regulation of pre-T cell receptor (pT α -TCR β) gene expression during human thymic development. *J. Exp. Med.* 184:519.
- Barber, D. F., L. Passoni, L. Wen, L. Geng, and A. C. Hayday. 1998. The expression *in vivo* of a second isoform of pT α : implications for the mechanism of pT α action. *J. Immunol.* 161:11.
- Saint-Ruf, C., O. Lechner, J. Fehling, and H. von Boehmer. 1998. Genomic structure of the human pre-T cell receptor α chain and expression of two mRNA isoforms. *Eur. J. Immunol.* 28:3824.
- Carrasco, Y. R., A. R. Ramiro, C. Trigueros, V. G. de Yébenes, M. García-Peydró, and M. L. Toribio. 2001. An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor TCR α chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels. *J. Exp. Med.* 193:1045.
- Arnaud, J., A. Huchénq, M. C. Vernhes, S. Caspar-Bauguil, F. Lenfant, J. Sancho, C. Terhorst, and B. Rubin. 1997. The interchain disulfide bond between TCR $\alpha\beta$ heterodimers on human T cells is not required for TCR-CD3 membrane expression and signal transduction. *Int. Immunol.* 9:615.
- Sauquillo, A. G., A. Roumier, E. Teixeira, R. Bragado, and B. Alarcón. 1998. T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP70/CD3- ζ association. *J. Exp. Med.* 187:1179.
- Cinek, T., and V. Horejsi. 1992. The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J. Immunol.* 149:2262.
- Wiest, D. L., M. A. Berger, and M. Carleton. 1999. Control of early thymocyte development by the pre-T cell receptor complex: a receptor without a ligand? *Semin. Immunol.* 11:251.
- Zwollo, P., H. Arrieta, K. Ede, K. Molinder, S. Desiderio, and R. Pollock. 1997. The Pax-5 gene is alternatively spliced during B-cell development. *J. Biol. Chem.* 272:10160.
- Koyasu, S., L. K. Clayton, A. Lerner, H. Heiken, A. Parkes, and E. L. Reinherz. 1997. Pre-TCR signaling components trigger transcriptional activation of a rearranged TCR α gene locus and silencing of the pre-TCR α locus: implications for intrathymic differentiation. *Int. Immunol.* 9:1475.
- Trop, S., M. Rhodes, D. L. Wiest, P. Hugo, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2000. Competitive displacement of pT α by TCR- α during TCR assembly prevents surface coexpression of pre-TCR and $\alpha\beta$ TCR. *J. Immunol.* 165:5566.
- Voll, R. E., E. Jimi, R. J. Phillips, D. F. Barber, M. Rincon, A. C. Hayday, R. A. Flavell, and S. Ghosh. 2000. NF- κ B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity* 13:677.

Regulation of surface expression of the human pre-T cell receptor complex

Yolanda R. Carrasco, María N. Navarro, Virginia G. de Yébenes, Almudena R. Ramiro¹ and María L. Toribio*

Considerable progress has recently been made in defining the role that pre-antigen receptor complexes, namely the pre-T and pre-B cell receptors, play in lymphocyte development. It is now established that these receptors direct, in a similar way, the survival, expansion, clonality and further differentiation of pre-T and pre-B lymphocytes, respectively. However, less is known about the mechanisms which ensure that only minute amounts of pre-TCR and pre-BCR reach the plasma membrane of developing lymphocytes. In this review, we discuss the implications of recent experimental approaches which address the developmental regulation of human pre-TCR expression and the molecular mechanisms that control surface pre-TCR expression levels.

Key words: endocytosis / ER retention / intracellular degradation / pT α cytoplasmic tail / pre-T cell receptor

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

Development of $\alpha\beta$ lineage T cells within the thymus involves a highly ordered and tightly regulated maturation program (reviewed in References 1–6) which is controlled at successive check-points through two molecular sensors, the pre-T cell receptor (pre-TCR) and the mature TCR $\alpha\beta$, which are sequentially expressed during intrathymic development.^{7–10} Early pre-T cells that succeed in productive rearrangements at the TCR β locus express a functional TCR β

chain which pairs with an invariant pre-TCR α (pT α) chain and associates with CD3 subunits to form the pre-TCR.^{10–14} Exit of this pre-TCR:CD3 complex from the endoplasmic reticulum (ER) and expression at the cell surface¹⁵ seem necessary for triggering a process, known as β -selection,^{16,17} that: (i) induces the expansion and further differentiation of developing pre-T cells; (ii) enforces allelic exclusion at the TCR β locus; and (iii) results in the induction of rearrangements at the TCR α locus,^{16–20} apparently in a ligand-independent manner.^{21,22} Upon productive TCR α gene rearrangements and substitution of pT α by TCR α , the mature TCR $\alpha\beta$ is expressed associated with CD3 on the cell surface, and thymocytes are then allowed to undergo a second step of selection, known as positive or TCR $\alpha\beta$ selection, upon binding to self-peptide-MHC complexes expressed on thymic epithelial cells.^{1–4,6,8} Despite experimental evidence showing the similar biochemical composition of the pre-TCR and TCR,^{10–14} mechanisms regulating the assembly and intracellular transport of each complex appear to differ markedly, since the pre-TCR is expressed only transiently and very inefficiently during thymocyte development.^{8–10} Major issues are how surface expression of the pre-TCR is regulated during normal thymocyte development to ensure its stage-specific function, and which are the molecular mechanisms underlying its limited expression on the cell surface. Both issues will be discussed in this review, with emphasis on recent experimental evidence relating to the developmental regulation of human pT α gene transcription and the dynamics of pre-TCR surface expression and internalization.

Pre-T cell stages in the human thymus

Thymocyte development in mouse and man follows a similar sequence of differentiation events, but different markers have proved useful in defining the

From the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. ¹Present address: The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021, USA. *Corresponding author. E-mail: mtoribio@cbm.uam.es

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
1044-5323 / 02 / \$- see front matter

earliest T cell developmental stages in each species. In humans, the hematopoietic precursors that seed the postnatal thymus are CD4⁻CD8⁻ 'double negative' (DN) cells, which express high surface levels of CD34 and still lack the common thymocyte marker CD1a.^{23,24} Cells at this stage (0.05–0.1% of total postnatal thymocytes)²⁴ still have their TCR δ , TCR γ , TCR α and TCR β loci in the germline configuration, and represent pro-T cells that can serve as lymphomyeloid progenitors able to generate T cells and also thymic NK cells, dendritic cells (DC), and monocytes.^{24–29} Differentiation of pro-T cells into the T-cell lineage proceeds through several pre-T cell stages characterized by the progressive loss of CD34 and the sequential acquisition of CD1a, CD4, and CD8 before expression of the TCR $\alpha\beta$ and final differentiation either into CD4⁺CD8⁻ or CD4⁻CD8⁺ 'single positive' (SP) mature T cells^{6,23,30,31} (Figure 1). Notably, CD1a acquisition is associated with loss of NK/DC/myeloid potential^{32,33} and hence with commitment to the T-cell lineage, which concurs with the findings that complete TCR δ gene rearrangements²⁷ and RAG gene transcription²⁸ begin at this stage. Thus, CD34⁺CD1a⁺ DN thymocytes represent the earliest pre-T cells, and will hereafter be referred to as pre-T1 cells. In contrast to mice, progression from

DN to CD4⁺CD8⁺ 'double positive' (DP) thymocytes occurs in humans through CD4⁺CD8⁻ intermediates that represent the immediate progeny of pre-T1 cells,^{30,31} and are thus referred to as pre-T2 cells. CD4⁺ pre-T2 cells display complete TCR γ and TCR δ gene rearrangements^{27,29} and represent the stage at which partial D-J β rearrangements and immature TCR β transcription are initiated; while complete V-D-J β rearrangement, full-length TCR β transcription, and expression of cytoplasmic TCR β become prominent at the downstream CD4⁺CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁻ pre-T3 stage.^{27,28} These data indicate a hierarchy in TCR rearrangements in which the TCR δ locus rearranges first, followed by TCR γ and then TCR β , before rearrangements at the TCR α locus occur.²⁷

Close similarities exist between murine pre-T cells at the DN3 stage¹⁷ and human thymocytes at the pre-T3 stage. Human pre-T3 cells represent a heterogeneous population composed of about one third of large-sized cycling cells, and two thirds comprising cells of the expected size, which are arrested in G0/G1.³⁴ As proposed for their murine counterparts,¹⁷ these two subsets will hereafter be referred to as the L and E subsets of pre-T3 cells, respectively. Unlike pre-T3 E cells, essentially all pre-T3 L cells express the TCR β chain in the cytoplasm, indicating that they have

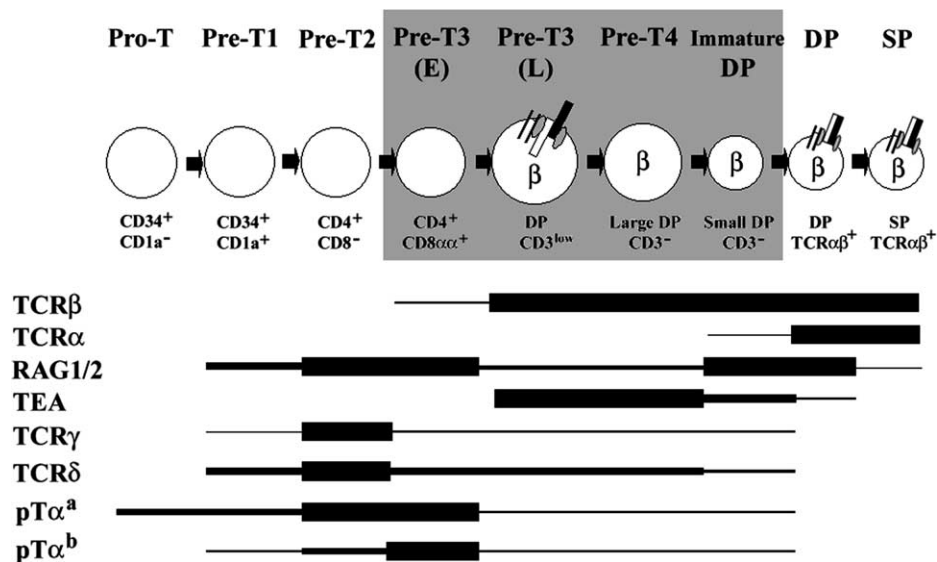


Figure 1. Schematic representation of human intrathymic T cell developmental stages. Cell surface markers commonly used to define human intrathymic subsets are indicated in the top panel. The proposed developmental sequence is based on functional studies.^{23–26,30–35} DP TCR $\alpha\beta$ ⁻ pre-T cell stages are included in the shaded box. The bottom panel shows the developmental expression of the indicated transcripts. Line thickness is proportional to the relative amounts of mature-length mRNA, which were determined by Northern blotting; except for pT α^a and pT α^b , which were determined by real-time quantitative RT-PCR.

succeeded in a productive TCR β rearrangement and have passed through β -selection. In addition, phenotypic differences exist between the E and L human subsets regarding expression of the CD8 molecule, which is expressed as a CD8 $\alpha\alpha$ homodimer in E pre-T3 cells, but displays its common CD8 $\alpha\beta$ heterodimeric form in L cells.³⁵ Functional studies showing that CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ E cells are the immediate progeny of CD4⁺CD8⁻ pre-T2 cells and the direct precursors of CD4⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁺ L pre-T3 thymocytes led to the conclusion that the transition from CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ to CD4⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁺ represents the critical developmental point at which β -selection promotes the clonal expansion and further differentiation of human pre-T cells independently of TCR α .³⁵ Moreover, they confirmed the physiological relevance of CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁻ thymocytes, a minute cell subset (<2% of total human thymocytes) identified by Spits and coworkers³⁶ and shown to represent the developmental stage at which complete rearrangements at the TCR β locus first take place.²⁷ Therefore, expression of a functional TCR β chain may occur immediately prior to the formation of the CD4⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁺ DP L subset,^{27,28} and hence upregulation of CD8 β can be considered as a marker of β -selection in human thymocyte development.³⁵ Supporting this contention, a number of developmental events associated with β -selection parallel the onset of CD8 β expression. These include downregulation of RAG1 and RAG2 expression, an event that may contribute to allelic exclusion at the TCR β locus,^{17,37} and induction of T early α (TEA) transcription, which is an obligatory early event in the opening of the TCR α locus for subsequent rearrangements³⁸ (Figure 1). This is the case also for other events linked to progression through DNA synthesis such as the expression of Cyclins A and B, and the hyperphosphorylation of Retinoblastoma (Rb).^{34,35}

Developmental regulation of surface pre-TCR expression

Experimental data concerning the regulation of surface pre-TCR expression on primary thymocytes are scarce, both in mouse and man; most likely because of difficulties in detecting the limited amounts of pre-TCR:CD3 complexes that reach the plasma membrane of pre-T cells (reviewed in Reference 9). The first evidence of surface pre-TCR expression in normal thymocytes *in vivo* came from studies in humans and showed that about half of thymocytes within the

large-sized DP TCR $\alpha\beta$ ⁻ subset, which correspond in fact to the so-called L pre-T3 cells, express very low but detectable levels of surface CD3 in the absence of the conventional TCR $\alpha\beta$, whereas the other half lacks CD3.³⁴ Combined transcription of pT α and TCR β genes occurs in such CD3^{low} thymocytes^{28,34,39} (Figure 1), supporting the expression of a putative CD3-associated pre-TCR. In fact, biochemical studies showed that CD3^{low} thymocytes express on the cell surface a TCR β -containing complex, distinct from the mature TCR $\alpha\beta$ heterodimer, with a molecular mass that matched that expected for a human pT α -TCR β disulphide-linked heterodimer.³⁴ Confirmation of this possibility came only with the development of suitable anti-pT α reagents. These studies showed that essentially all CD3^{low} thymocytes display specific reactivity with an anti-pT α antibody raised against a synthetic peptide contained in the extracellular (EC) Ig-like domain of the human pT α molecule; indicating that in fact they express a surface CD3-associated pre-TCR.³⁴ In contrast, no anti-pT α reactivity was found on the remaining CD3⁻ fraction of DP TCR $\alpha\beta$ ⁻ thymocytes despite their proliferation status and their homogeneous expression of intracytoplasmic TCR β chain. As cells in this latter subset were found to represent the immediate progeny of the CD3^{low} L pre-T3 cells, they are considered to be at a downstream, pre-T4 developmental stage³⁴ (Figure 1).

In addition to pre-T4 thymocytes, a novel CD3⁻ subset of small-sized DP TCR $\alpha\beta$ ⁻ thymocytes lacking surface pT α , but expressing cytoplasmic TCR β , has been identified in the human thymus (immature DP in Figure 1). Importantly, cells at this stage have proved to be functional intermediates between pre-T4 cells and conventional TCR $\alpha\beta$ ⁺ DP thymocytes, and represent late noncycling pre-T cells in which RAG gene re-expression and TEA transcriptional shutdown are coincident events associated with cell cycle arrest, and immediately preceding TCR α gene expression.³⁴ Accordingly, as reported in mice,⁴⁰ surface expression of the mature TCR $\alpha\beta$:CD3 complex is first detectable in the human thymus on small nonproliferating DP thymocytes.³⁴ Thus, as a whole, available information indicates that developmental expression of surface pre-TCR in humans is time- and stage-specific, and supports a developmental model in which pre-T cells that succeed in a functional TCR β rearrangement and express a pre-TCR complex are brought into cycle, but rapidly downregulate surface pre-TCR expression; finally returning to slow cycling conditions to become small resting

pre-T cells before the onset of TCR α gene expression (Figure 1).

Transcriptional regulation and function of human pT α^a and pT α^b spliced isoforms

Analyses comparing the complete pT α gene sequence with pT α cDNA have revealed an intron/exon organization shared by mouse and man⁴¹. Four pT α exons have been identified, which correspond to the different domains of the protein [Figure 2(A)]. In humans, the first exon contains the 5' untranslated sequence, the leader peptide and the first three aminoacids (aa) of the mature protein. Exon 2 encodes 105 aa of the EC Ig-like domain, including the two cysteines involved in formation of the Ig intra-chain disulfide bridge. Exon 3 encodes 16 aa, which form the connecting peptide (CP) containing the cysteine residues required for dimerization with the

TCR β chain. Exon 4 encodes the 139 aa which comprise the transmembrane (TM) region and the cytoplasmic (CY) tail. Exons 2 and 3 have the same size in humans and mice, and show more than 80% homology, while no significant homology exists between the 114-aa human CY tail and the 31 aa of the murine CY domain.^{28,39,41}

Besides the conventional pT α transcript, named pT α^a , a second transcript, derived from the pT α locus by tissue-specific alternative splicing, has been identified in mouse⁴² and man.⁴¹ In this novel pT α isoform, termed pT α^b , the second exon is spliced out, thus producing a pT α protein that lacks most of the EC Ig-like domain [Figure 2(A)], but retains the cysteine residue thought to be involved in heterodimerization. Conservation of the splice sites in mouse and man suggests that pT α^b may play an important role in T cell development.

Available information on the biological activity of pT α^b comes from genetic complementation approaches, which revealed that pT α^b transgenes can completely restore the block in $\alpha\beta$ T cell development in pT $\alpha^{-/-}$ mice.⁴³ This concurs with the finding that a truncated pT α form lacking the Ig-like exodomain, when expressed together with a truncated TCR β , can restore T cell development in RAG-deficient mice.²¹ Consequently, it appears that both pT α isoforms are able to trigger intracellular signaling and β -selection independently of ligand binding. The question is whether or not pT α^b is competent to signal from the cell surface as part of an alternative pre-TCR that, like pT α^a -containing complexes, could be endowed with cell-autonomous signaling capacity due to its association with signaling molecules into glycolipid-enriched membrane domains (rafts).⁴⁴ Alternatively, since an asymmetrical pre-TCR complex such as the putative pT $\alpha\beta$ -TCR β heterodimer would be neither stable nor properly assembled and expressed on the cell surface,²¹ a second possibility is that, as discussed by others for pT α^a , pT α^b -mediated signaling is triggered intracellularly.⁴⁵

Studies by Barber *et al.*⁴² showing that pT α^b is more efficient than pT α^a at inducing surface expression of transfected TCR β on murine TCR $\alpha\beta$ -deficient cells would support the first possibility. However, available data are markedly different in human cell transfectants. Here phenotypic, biochemical and functional evidence has been produced showing that only the pT α^a isoform is capable of inducing surface expression of a signaling-competent, raft-associated pre-TCR complex; whereas pT α^b pairs with and retains TCR β intracellularly.⁴⁶ Despite their different ability to

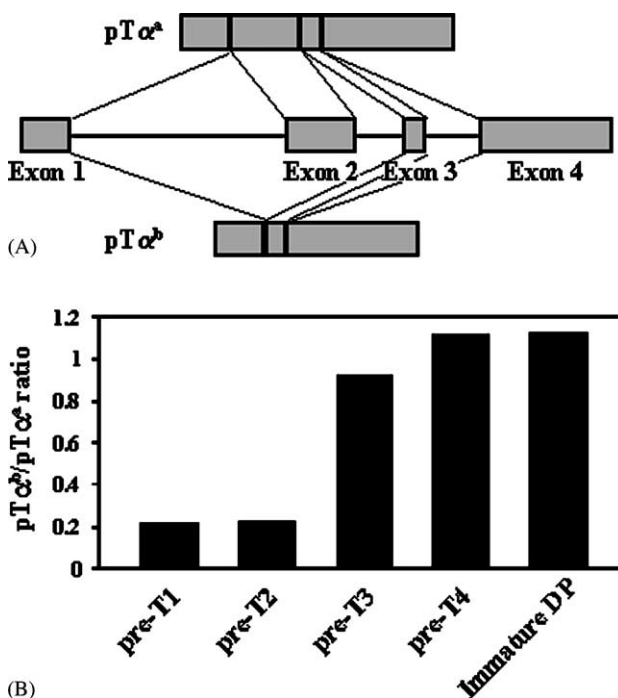


Figure 2. Differential expression of pT α^a and pT α^b spliced isoforms during human intrathymic development. (A) Exon composition of pT α^a and pT α^b isoforms. (B) pT α^b /pT α^a transcriptional ratio at successive human T cell developmental stages. Relative transcriptional amounts determined by real-time quantitative RT-PCR are given in arbitrary units. Results are representative of four independent experiments.

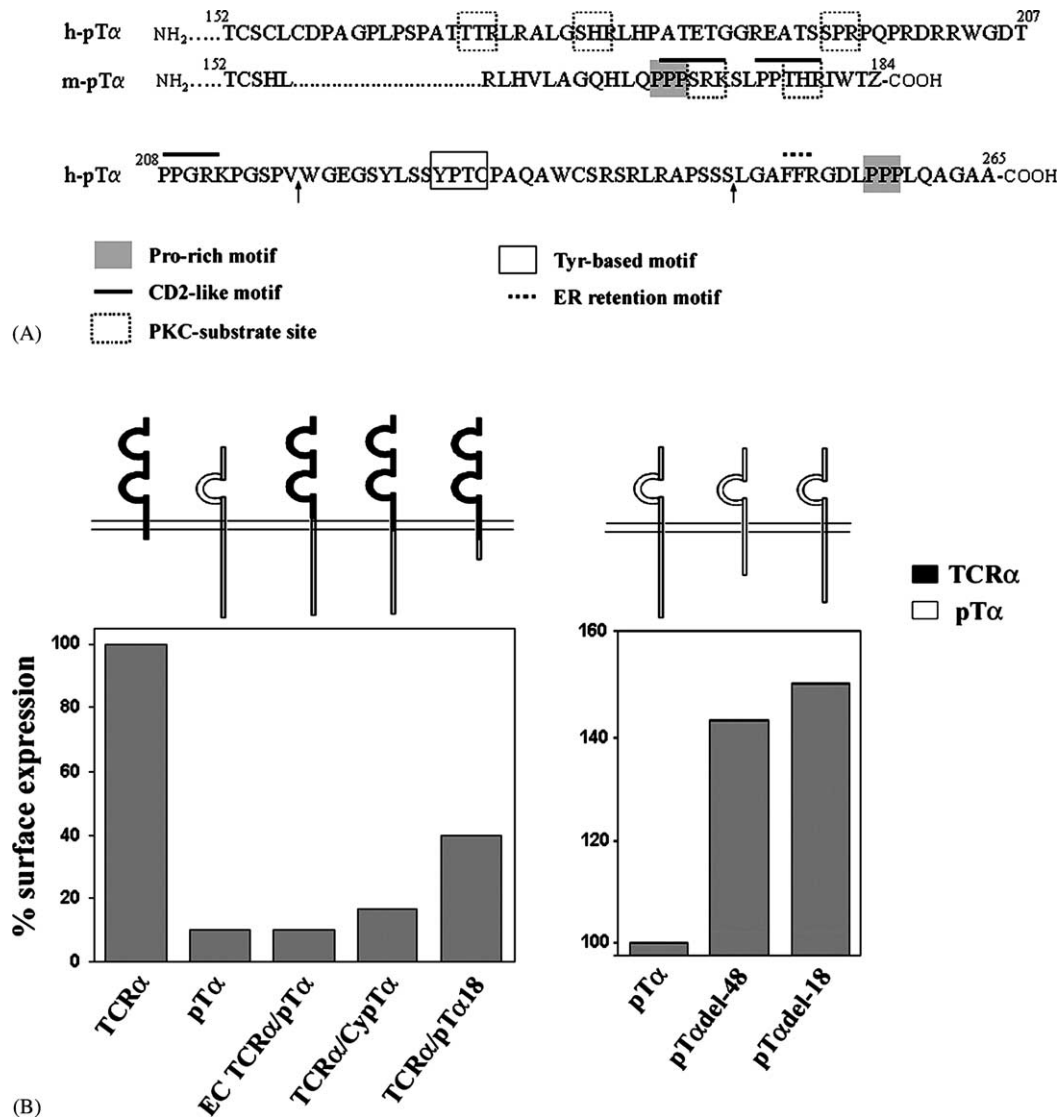


Figure 3. The human pTα cytoplasmic regulates surface pre-TCR expression level. (A) Comparison and alignment of the amino-acid sequences of the human and mouse pTα cytoplasmic domains. Locations of the potential PKC phosphorylation sites, proline-rich motifs, and CD2-like domains, and of the tyrosine-based internalization motif and the phenylalanine-containing ER retention motif are indicated. (B) Surface expression of chimeric TCR (TCRα/pTα) complexes (left panel) and truncated pre-TCR (pTαdel) complexes (right panel). The upper portions of each panel show cartoons of the structure of the chimeric and truncated molecules analyzed, with their corresponding relative surface expression levels shown in the lower portions. (Left panel) TCRα-deficient human Jurkat mutants (JR.311)⁴⁶ were transiently transfected either with wild-type TCRα or the indicated TCRα/pTα chimeras: EC TCRα/pTα, containing the EC TCRα domain and the TM and CY pTα domains; TCRα/CypTα, containing the EC and TM TCRα domains and the CY pTα domain; and TCRα/pTα18, in which the 18 COOH-terminal residues of the pTα tail were appended to the TCRα chain. Surface expression of the chimeric or wild-type TCR complexes was analyzed by flow cytometry with an anti-Vα12.1 mAb. Surface expression levels of a transfected wild-type pTα chain were analyzed with an anti-CD3ε mAb and are shown for comparison. (Right panel) JR.311 cells transiently transfected either with wild-type pTα or with truncated pTα forms lacking the 48 (pTαdel-48) or the 18 (pTαdel-18) COOH-terminal residues of the cytoplasmic domain were analyzed for surface pre-TCR expression with an anti-CD3ε mAb. Deletion sites are indicated by arrows in (A). Data are represented as the percentage of surface expression of TCR or pTα wild-type controls, as indicated.

reach the plasma membrane, both human pT α isoforms display a preferential cytoplasmic localization and are retained in the ER, probably due to a shared ER retention motif present in the CY domain^{46,47} (see below). In this regard, recent studies on transfected pre-T cells have shown that overexpression of human pT α^b inhibits or reduces surface expression of conventional pT α^a -TCR β heterodimers in a dose-dependent manner⁴⁶. This suggests that pT α^b may compete with pT α^a for its association with TCR β and/or CD3, thus regulating exit from the ER and/or surface expression of the pre-TCR.^{41,46} The lack of an equivalent ER retention signal in the murine pT α CY domain [see Figure 3(A)] would support species-specific functional differences.

An important question is whether or not physiological amounts of pT α^b mRNA, which is on average about 10-fold less abundant than pT α^a in the whole thymocyte population,^{42,46} can support the proposed competitive role. Consistent with this possibility, quantitative studies have shown that expression of pT α^a and pT α^b spliced products is differentially regulated during human intrathymic development. As summarized in Figure 1, pT α^a transcription spans all pro/pre-T cell developmental stages,^{28,39,46} but the onset of pT α^b transcription is developmentally delayed, so that combined expression of pT α^a and pT α^b messages is maximal at the β -selection checkpoint. Thereafter, β -selection results in simultaneous transcriptional shutdown of both isoforms, but pT α^b mRNA consistently decreases less dramatically (fivefold on average), hence causing an increased pT α^b :pT α^a ratio in β -selected versus nonselected pre-T cells⁴⁶ [Figure 2(B)]. Consequently, pT α^b function may be restricted to a narrow developmental window immediately following surface pre-TCR expression and β -selection, which is compatible with its proposed role as a negative regulator of pre-TCR activity. This tightly regulated developmental expression of pT α resembles that recently reported for the alternatively spliced products of Pax-5 that regulate Pax-5 activity during B cell development.⁴⁸ According to this view, transcriptional regulation of pT α could account for the restricted developmental expression of the pre-TCR at stages preceding TCR α chain expression. Therefore, competitive displacement of pT α by TCR α during TCR $\alpha\beta$ assembly, although proved functionally relevant in mice *in vitro*,⁴⁹ would not be required to control surface pre-TCR expression *in vivo*. This concurs with the finding that signaling through the pre-TCR triggers both transcriptional activation of TCR α and silencing of the pT α locus in mice.^{19,50}

Low surface pre-TCR expression is pT α -chain dependent: the pT α cytoplasmic domain can serve as an ER retention signal

The inefficient expression of pre-TCR complexes on pre-T cells is reminiscent of the limited expression of the pre-BCR on pre-B cells, and may be related to the particular signaling function of pre-TCR/BCR complexes during lymphoid development (reviewed in Reference 9). Is the expression level of pre-antigen receptors determined by their specific structural properties, or is it intrinsic to the particular developmental stage at which the receptors are expressed? Whereas studies on the assembly and intracellular transport of the pre-BCR complex support the latter possibility,⁵¹ independent studies in mice and humans lead to the shared view that structural differences between the pre-TCR and the TCR endow these surface receptors with unique signaling capabilities and surface expression patterns.^{45,47,52} Apart from the pT α and TCR α chains, the pre-TCR and TCR have an identical sub-unit composition (i.e. TCR β associated with CD3 γ , δ , ϵ , and ζ);^{8,9,45} although the CP domain of murine pT α (as opposed to the equivalent domain in TCR α) dictates a weak association with the ζ subunit,⁵² which might affect the assembly rate and stability of the pre-TCR. However, human TCR complexes in which the TCR α chain is substituted with a chimeric TCR α /pT α chain containing the pT α CP domain are equally as capable of mediating association with the ζ subunit⁴⁷ as wild-type TCR complexes. Moreover, overexpression of wild-type TCR α in pre-T cells prevents neither cell-surface expression of endogenous pre-TCR nor its association with all the γ , δ , ϵ , and ζ CD3 subunits; rather, both TCR and pre-TCR complexes can be co-expressed at the cell surface at the expected levels.⁴⁷ Therefore, low surface expression of the human pre-TCR does not result from its impaired association with the ζ chain. Neither can it result from impaired assembly of CD3 γ , ϵ , and δ subunits.⁴⁷

Apart from the lack of homology of the CP domains, other structural differences exist between pT α and TCR α . Remarkably, the EC domain of pT α contains only one Ig-like loop, compared to two in TCR α , which suggests the requirement for an additional Vpre-T chain (analogous to the pre-BCR-associated Vpre-B subunit) that would provide a symmetrical shape to the pT α -TCR β heterodimer.^{8-10,21,45} However, there is little experimental evidence for the structural requirement of a Vpre-T chain.^{12,45} Particularly, it has been shown that replacement of the human pT α EC

domain with the TCR α EC region does not affect surface expression levels of a chimeric pre-TCR⁴⁷ [Figure 3(B)]. Also, surface pre-TCR expression is not impaired in human mature T cells,^{46,47} which like their murine counterparts may lack the putative Vpre-T subunit.¹² Moreover, no candidate Vpre-T chain has been identified to date, which would support the view that the absence in pT α of a partner domain capable of pairing with the hydrophobic surface of the V β domain is not responsible for impaired surface expression of the pre-TCR complex.^{8–10} A major structural difference that distinguishes pT α from TCR α lies in the CY domain, which is extremely long in pT α , but reduced to a few residues in other TCR or Ig chains. Despite complete divergence in the pT α CY domains in mice and humans (31 and 114 residues, respectively), a number of distinct components of the CY domain are conserved [Figure 3(A)], and include a juxtamembrane cysteine which may contribute to raft association,⁴⁴ a potential protein kinase C (PKC) substrate site, a short proline-rich motif, and a CD2-like motif that mediates signal transduction in mature T cells^{53,54} [Figure 3(A)]. Their conservation suggests a prominent role for the pT α CY tail in the regulation of pre-TCR signaling.⁵³ Although the finding that a murine pT α tail-less molecule is biologically active does not support this view,^{43,55} our recent studies have established a prominent role for the pT α CY tail in the regulation of stability and expression of the pre-TCR. This proposal is based on the finding that the human pT α CY domain is sufficient to reduce surface expression of a conventional TCR $\alpha\beta$ complex to pre-TCR expression levels.⁴⁷ Since the pT α CY tail also confers impaired surface expression and ER retention properties to individual surface molecules such as CD25 and CD4, the human pT α CY domain has been proposed to function as an ER retention signal.⁴⁷ In fact, sequential truncations along the pT α CY tail have revealed that removal of the COOH-terminal 48 residues results in enhanced pre-TCR expression [Figure 3(B)], supporting the view that the pT α ER retention function contributes to the regulation of surface pre-TCR expression.⁴⁷ More recent studies have confirmed and extended these results by showing that the ER retention function of human pT α maps within the COOH-terminal 18 residues of the CY domain, which comprise a phenylalanine-containing motif [FF in Figure 3(B)]. This motif has been shown by others to interact with the coatomer (COPI), a cytosolic complex that plays a key role in diverse steps of intracellular protein transport, particularly in retrograde Golgi-to-ER transport.^{56,57} Accordingly, it is

possible that binding of COPI to the FF motif of the pT α CY domain may result in ER retention of the unassembled pT α chain in an analogous way to that reported for the ER retained CD3 ϵ subunit,^{57,58} and thus serves a quality control function in pre-TCR assembly that may partly contribute to the regulation of surface pre-TCR levels. As discussed above, an equivalent motif is lacking in the murine CY domain, which suggests different ER retention properties of pT α in mice and humans.

Constitutive internalization and degradation of the human pre-TCR

The level of expression of a cell surface receptor is the result of an equilibrium between the synthesis and transport of new polypeptides and their internalization, recycling, and degradation (reviewed in Reference 59). Extracellular stimuli induce changes in one or several of these processes and thereby modify the level of expression of a given receptor. In the particular case of the TCR, complexes are continuously internalized and recycled back to the cell surface in non-stimulated cells,^{60,61} but ligand binding leads to the intracellular retention and degradation of internalized receptors.^{62–64} This results in the downregulation of TCR surface expression, which represents a critical event intimately associated with TCR signaling and T cell activation.^{65,66} If signaling through the pre-TCR is ligand-independent, the question arises as to what is the fate of such ‘unligated’ pre-TCR complexes.

Our recent attempts made to compare the dynamics of TCR and pre-TCR cell surface expression and internalization have revealed that, in stark contrast to the TCR, pre-TCR complexes expressed on nonstimulated human pre-T cells are continually internalized but do not recycle back to the cell surface. Rather, internalized pre-TCR complexes follow the intracellular fate of ligated TCR complexes and are degraded intracellularly by lysosomes and proteasomes.⁶⁷ Therefore, the pre-TCR behaves constitutively as an ‘activated’ TCR without any need for ligand binding. A likely explanation for this finding is that spontaneous clustering of the pre-TCR with lipid raft-associated molecules would elicit cell-autonomous activation of proximal signaling events, identical to those induced upon raft aggregation following TCR crosslinking,^{68–70} which would eventually lead to receptor endocytosis and degradation. However, specific endocytic and degradative mechanisms coupled to raft-association of the pre-TCR may exist constitutively in pre-T cells,

as has recently been described for the IL-2 receptor.⁷¹ The structural features responsible for this pre-TCR property would again map to the pT α CY domain. In support of this view, we have observed that constitutive receptor internalization and degradation can be conferred to the conventional TCR by appending the pT α CY domain to the TCR α chain⁶⁷ [see Figure 3(B)].

The precise nature of the molecular machinery involved in constitutive pre-TCR internalization and degradation has not been established, although two nonexclusive hypotheses are currently under study. One is that the same CD3 cytoplasmic endocytic motifs and molecular pathways (either tyrosine kinase-dependent or -independent) involved in ligand-induced TCR downregulation⁵⁹ would regulate the pre-TCR intracellular fate. A second possibility is that endocytic properties of pre-TCR complexes are pT α chain-specific. This seems a likely possibility considering that the human pT α CY tail contains a tyrosine-based internalization motif⁷² [Figure 3(A)], which may become cell-autonomously exposed in the 'activated' pre-TCR conformation to fulfill internalization and/or lysosomal sorting functions. The lack of an equivalent motif in the murine pT α tail suggests again species-specific functional differences. Whatever the mechanism involved, the structural features of pT α may ensure that accumulation of the pre-TCR at the plasma membrane would immediately lead to its downregulation from the cell surface, providing a strict control of the extent of cellular activation (reviewed in Reference 59). Thus, as previously proposed,⁴³ pT α may have specifically evolved to provide the cell with a self-safe mechanism that avoids sustained ligand-independent signaling through a potent, potentially oncogenic, cell growth receptor. As a result, *in vivo* expression of the pre-TCR occurs at very low levels during a limited developmental window.

Note added in proof

Since acceptance of this paper, Aifantis *et al.* (Nature Immunol 3:483–488 (2002)) have refuted the view that the CY domain of murine pT α is dispensable for pre-TCR function by showing that truncation of the pT α CY tail results in defective pre-TCR signalling and impaired $\alpha\beta$ T cell development in mice.

Acknowledgements

We would like to thank past members of the laboratory, especially C. Trigueros and C. Márquez, for

their contributions to our present knowledge on early human T cell development. Special thanks go to B. Alarcón and J.R. Regueiro for helpful discussions and suggestions. This work was made possible by support from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Fondo de Investigación Sanitaria, Comunidad Autónoma de Madrid and the Fundación Eugenio Rodríguez Pascual. Institutional support from the Fundación Ramón Areces is also acknowledged.

References

1. Kieselow P, von Boehmer H (1995) Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 58:87–209
2. Shortman K, Wu L (1996) Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* 14:29–47
3. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ (1996) Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14:73–99
4. Zúñiga-Pflücker JC, Lenardo MJ (1996) Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr Opin Immunol* 8(2):215–224
5. Fehling HJ, von Boehmer H (1997) Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr Opin Immunol* 9:263–275
6. Res P, Spits H (1999) Developmental stages in the human thymus. *Semin Immunol* 11:39–46
7. Godfrey DI, Zlotnik A (1993) Control points in early T cell development. *Immunol Today* 14:547–553
8. Malissen B, Ardouin L, Lin SY, Gillet A, Malissen M (1999) Functions of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv Immunol* 72:103–148
9. Borst J, Jacobs H, Brouns G (1996) Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 8:181–190
10. von Boehmer H, Fehling HJ (1997) Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 15:433–452
11. Groettrup M, Ungewiss K, Azogui O, Palacios R, Owen MJ, Hayday AC, von Boehmer H (1993) A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kDa glycoprotein. *Cell* 75:283–294
12. Saint-Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M, Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H (1994) Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266:1208–1212
13. Berger MA, Davé V, Rhodes MR, Bosma GC, Bosma MJ, Kappes DJ, Wiest DL (1997) Subunit composition of pre-T cell receptor complexes expressed by primary thymocytes: CD3 delta is physically associated but not functionally required. *J Exp Med* 186:1461–1467
14. van Oers NS, von Boehmer H, Weiss A (1995) The pre-T cell receptor (TCR) complex is functionally coupled to the TCR-zeta subunit. *J Exp Med* 182:1585–1590
15. O'Shea CC, Thornell AP, Rosewell IR, Hayes B, Owen MJ (1997) Exit of the pre-TCR from the ER/*cis*-Golgi is necessary for signaling differentiation, proliferation, and allelic exclusion in immature thymocytes. *Immunity* 7:591–599
16. Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday AC (1994) T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection

- during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1:83–93
17. Hoffman ES, Passoni L, Crompton T, Leu TM, Schatz DG, Koff A, Owen MJ, Hayday AC (1996) Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development *in vivo*. *Genes Dev* 10:948–962
 18. Aifantis I, Buer J, von Boehmer H, Azogui O (1997) Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus. *Immunity* 7:601–607
 19. Levelt CN, Wang B, Ehrfeld A, Terhorst C, Eichmann K (1995) Regulation of T cell receptor (TCR)-beta locus allelic exclusion and initiation of TCR-alpha locus rearrangement in immature thymocytes by signaling through the CD3 complex. *Eur J Immunol* 25:1257–1261
 20. Fehling HJ, Krotkova A, Saint-Ruf C, von Boehmer H (1995) Crucial role of the pre-T cell receptor gene in development of $\alpha\beta$ but not $\gamma\delta$ T cells. *Nature* 375:795–798
 21. Irving BA, Alt FW, Killeen N (1998) Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280:905–908
 22. Jacobs H, Iacomini J, van de Ven M, Tonegawa S, Berns A (1996) Domains of the TCR beta-chain required for early thymocyte development. *J Exp Med* 184:1833–1843
 23. Galy A, Verma S, Bárcena A, Spits H (1993) Precursors of CD3⁺CD4⁺CD8⁺ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J Exp Med* 178:391–401
 24. Márquez C, Trigueros C, Fernández E, Toribio ML (1995) The development of T and non-T cell lineages from CD34⁺ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J Exp Med* 181:475–483
 25. Res P, Martínez-Cáceres E, Jaleco AC, Noteboom E, Weijer K, Spits H (1996) CD34⁺ CD38^{dim} cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer and dendritic cells but are distinct from stem cells. *Blood* 87:5196–5206
 26. de Yébenes VG, Carrasco YR, Ramiro AR, Toribio ML (2002) Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the GM-CSF receptor. *Blood* 99:2948–2956
 27. Blom B, Verschuren MC, Heemskerk MH, Bakker AQ, van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ, Spits H (1999) TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* 93:3033–3043
 28. Ramiro AR, Trigueros C, Márquez C, San Millán JL, Toribio ML (1996) Regulation of pre-T cell receptor (pT α -TCR β) gene expression during human thymic development. *J Exp Med* 184:519–530
 29. Ktorza S, Sarun S, Rieux-Laucat F, de Villartay JP, Debré P, Schmitt C (1995) CD34-positive early human thymocytes: T cell receptor and cytokine receptor gene expression. *Eur J Immunol* 25:2471–2478
 30. Kraft DL, Weissman IL, Waller EK (1993) Differentiation of CD3⁺4⁺8⁺ human fetal thymocytes *in vivo*: characterization of a CD3⁺4⁺8⁺ intermediate. *J Exp Med* 178:265–277
 31. Peault B, Weissman IL, Baum C, McCune JM, Tsukamoto A (1991) Lymphoid reconstitution of the human fetal thymus in the SCID mice with CD34⁺ precursor cells. *J Exp Med* 174:1283–1287
 32. Sánchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL, Phillips JH (1994) Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* 180:569–576
 33. Márquez C, Trigueros C, Franco JM, Ramiro AR, Carrasco YR, López-Botet M, Toribio ML (1998) Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 91:2760–2771
 34. Trigueros C, Ramiro AR, Carrasco YR, de Yébenes VG, Albar JP, Toribio ML (1998) Identification of a late stage of small noncycling pT α ⁺ pre-T cells as immediate precursors of T cell receptor $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes. *J Exp Med* 188:1401–1412
 35. Carrasco YR, Trigueros C, Ramiro AR, de Yébenes VG, Toribio ML (1999) β -Selection is associated with the onset of CD8 β chain expression on CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ pre-T cells during human intrathymic development. *Blood* 94:3491–3498
 36. Hori T, Cupp J, Wrighton N, Lee F, Spits H (1991) Identification of a novel human thymocyte subset with a phenotype of CD3⁺CD4⁺CD8 α ⁺ β ⁺. Possible progeny of the CD3⁺CD4⁺CD8⁺ subset. *J Immunol* 146:4078–4084
 37. Li Z, Dordai DI, Lee J, Desiderio S (1996) A conserved degradation signal regulates RAG2 accumulation during cell division and links VDL recombination to the cell cycle. *Immunity* 5:575–589
 38. Wilson A, de Villartay JP, MacDonald HR (1996) T cell receptor γ gene rearrangement and T early α (TEA) expression in immature $\alpha\beta$ lineage thymocytes: implications for $\alpha\beta/\gamma\delta$ lineage commitment. *Immunity* 4:37–45
 39. Del Porto P, Bruno L, Mattei MG, von Boehmer H, Saint-Ruf C (1995) Cloning and comparative analysis of the human pre-T-cell receptor alpha-chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12105–12109
 40. Petrie HT, Livak F, Schatz DG, Strasser A, Crispe IN, Shortman K (1993) Multiple rearrangement in the T cell receptor α chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med* 178:615–622
 41. Saint-Ruf C, Lechner O, Feinberg J, von Boehmer H (1998) Genomic structure of the human pre-T cell receptor α chain and expression of two mRNA isoforms. *Eur J Immunol* 28:3824–3831
 42. Barber DF, Passoni L, Wen L, Geng L, Hayday AC (1998) The expression *in vivo* of a second isoform of pT α : implications for the mechanism of pT α action. *J Immunol* 161:11–16
 43. Gibbons D, Douglas NC, Barber DF, Liu Q, Sullo R, Geng L, Fehling H-J, von Boehmer H, Hayday AC (2001) The biological activity of natural and mutant pT α alleles. *J Exp Med* 194:695–703
 44. Saint-Ruf C, Panigada M, Azogui O, Debrey P, von Boehmer H, Grassi F (2000) Different initiation of pre-TCR and gamma-delta TCR signaling. *Nature* 406:521–527
 45. Wiest DL, Berger MA, Carleton M (1999) Control of early thymocyte development by the pre-T cell receptor complex: a receptor without a ligand? *Semin Immunol* 11:251–257
 46. Ramiro AR, Navarro MN, Carreira A, Carrasco YR, de Yébenes VG, Carrillo G, San Millán JL, Rubin B, Toribio ML (2001) Differential developmental regulation and functional effects on pre-TCR surface expression of human pT α^a and pT α^b spliced isoforms. *J Immunol* 167:5106–5114
 47. Carrasco YR, Ramiro AR, Trigueros C, de Yébenes VG, García-Peydró M, Toribio ML (2001) An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor TCR alpha chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels. *J Exp Med* 193:1045–1057
 48. Lowen M, Scott G, Zwollo P (2001) Functional analyses of two alternative isoforms of the transcription factor Pax-5. *J Biol Chem* 276:42565–42574

49. Trop S, Rhodes M, Wiest DL, Hugo P, Zúñiga-Pflücker JC (2000) Competitive displacement of pTalpha by TCR-alpha during TCR assembly prevents surface coexpression of pre-TCR and alphabeta TCR. *J Immunol* 165:5566–5572
50. Koyasu S, Clayton LK, Lerner A, Heiken H, Parkes A, Reinherz EL (1997) Pre-TCR signaling components trigger transcriptional activation of a rearranged TCR alpha gene locus and silencing of the pre-TCR alpha locus: implications for intrathymic differentiation. *Int Immunol* 9:1475–1480
51. Brouns GS, de Vries E, Neefjes JJ, Borst J (1996) Assembled pre-B cell receptor complexes are retained in the endoplasmic reticulum by a mechanism that is not selective for the pseudo-light chain. *J Biol Chem* 271:19272–19278
52. Trop S, Steff A-M, Denis F, Wiest DL, Hogo P (1999) The connecting peptide domain of pT α dictates weak association of the pre-T cell receptor with the TCR ζ subunit. *Eur J Immunol* 29:2187–2196
53. Hayday AC, Barber DF, Douglas N, Hoffman ES (1999) Signals involved in gamma/delta versus alpha/beta T cell lineage commitment. *Semin Immunol* 11:239–249
54. Nishizawa K, Freund C, Li J, Wagner G, Reinherz EL (1998) Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14897–15902
55. Fehling HJ, Iritani BM, Krotkova A, Forbush KA, Laplace C, Perlmutter RM, von Boemer H (1997) Restoration of thymopoiesis in pTalpha^{-/-} mice by anti-CD3 ϵ treatment or with transgenes encoding activated Lck or tailles pTalpha. *Immunity* 6:703–714
56. Fiedler K, Veit M, Stamnes MA, Rothman JE (1996) Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* 273:1396–1399
57. Cosson P, Lefkir Y, Démollière C, Letourneur F (1998) New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J* 23:6863–6870
58. Mallabiabarrena A, Jiménez MA, Rico R, Alarcón B (1995) A tyrosine-containing motif mediates ER retention of CD3-epsilon and adopts a helix-turn structure. *EMBO J* 14:2257–2268
59. Alcover A, Alarcón B (2000) Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* 20:325–346
60. Krangel MS (1987) Endocytosis and recycling of the T cell receptor complex. *J Exp Med* 165:1141–1159
61. Minami Y, Samelson LE, Klausner RD (1987) Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 262:13342–13347
62. Zanders ED, Lamb JR, Feldmann M, Green N, Beverley PC (1983) Tolerance of T-cell clones is associated with membrane antigen changes. *Nature* 303:625–627
63. Valitutti S, Müller S, Salio M, Lanzavecchia A (1997) Degradation of T-cell receptor (TCR)-CD3- ζ complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 185:1859–1864
64. Liu H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DAA (2000) On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13:665–675
65. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A (1995) Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148–150
66. Cai Z, Kishimoto H, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Sprent J (1997) Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 185:641–654
67. Carrasco YR, Toribio ML (2002) Constitutive internalization and degradation of the pre-T cell receptor conferred by the cytoplasmic domain of the pT α chain. Submitted
68. Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B (1998) Membrane compartmentalization is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:723–732
69. Montixi C, Langlet C, Bernard A-M, Thimonier J, Dubois C, Wurbel M-A, Chauvin J-P, Pierres M, He H-T (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J* 17:5334–5348
70. Janes PW, Ley SC, Magee AI, Panagiotis SK (2000) The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 12:23–34
71. Lamaze C, Dujancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 7:661–671
72. Sandoval IV, Bakke O (1994) Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol* 4:292–297

A Role for the Cytoplasmic Tail of the Pre-T Cell Receptor (TCR) α Chain in Promoting Constitutive Internalization and Degradation of the Pre-TCR*

Received for publication, May 20, 2002, and in revised form, November 18, 2002
Published, JBC Papers in Press, December 8, 2002, DOI 10.1074/jbc.M204944200

Yolanda R. Carrasco[§], María N. Navarro[§], and María L. Toribio[¶]

From the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Engagement of the $\alpha\beta$ T cell receptor (TCR) by its ligand results in the down-modulation of TCR cell surface expression, which is thought to be a central event in T cell activation. On the other hand, pre-TCR signaling is a key process in $\alpha\beta$ T cell development, which appears to proceed in a constitutive and ligand-independent manner. Here, comparative analyses on the dynamics of pre-TCR and TCR cell surface expression show that unligated pre-TCR complexes expressed on human pre-T cells behave as engaged TCR complexes, *i.e.* they are rapidly internalized and degraded in lysosomes and proteasomes but do not recycle back to the cell surface. Thus, pre-TCR down-regulation takes place constitutively without the need for extracellular ligation. By using TCR α /pT α chain chimeras, we demonstrate that prevention of recycling and induction of degradation are unique pre-TCR properties conferred by the cytoplasmic domain of the pT α chain. Finally, we show that pre-TCR internalization is a protein kinase C-independent process that involves the combination of *src* kinase-dependent and -independent pathways. These data suggest that constitutive pre-TCR down-modulation regulates pre-TCR surface expression levels and hence the extent of ligand-independent signaling through the pre-TCR.

During intrathymic development of $\alpha\beta$ T cells, thymocytes that have a successful rearrangement at the T cell receptor β (TCR β)¹ locus express a pre-TCR complex composed of the TCR β chain paired with the invariant pre-TCR α (pT α) chain and associated with CD3 components (1–3). Surface expression of this pre-TCR (4) triggers the selection, expansion, and further differentiation of developing pre-T cells in a ligand-inde-

pendent manner (5, 6), finally resulting in the induction of rearrangements at the TCR α locus. Upon productive TCR α gene rearrangements, the TCR α chain pairs with TCR β and associates with CD3 ϵ , γ , δ , and ζ chains, and thymocytes undergo a second step of selection upon binding of the TCR $\alpha\beta$ to self-peptide-major histocompatibility complex molecules (1–3). Despite experimental evidence on the similar biochemical compositions of the pre-TCR and TCR in terms of their associated CD3 subunits (7–9), current studies support the theory that mechanisms regulating the assembly and intracellular transport of these complexes may differ markedly, because the pre-TCR is expressed only transiently and very inefficiently during thymocyte development, at levels about 50–100-fold lower than those of the TCR on mature T cells (3, 10). By using TCR α -pT α chain chimeras, we have shown recently (9) that limited expression of the human pre-TCR is pT α chain-dependent. Particularly, the pT α cytoplasmic (Cy) domain was found to serve an endoplasmic reticulum retention function that could contribute in part to the regulation of pre-TCR assembly and surface expression (9).

However, the level of expression of a cell surface receptor is the result of an equilibrium between the synthesis and transport of new polypeptides and their internalization, recycling, and degradation (reviewed in Ref. 11). Extracellular stimuli induce changes in one or several of these processes and therefore modify the level of expression of a given receptor. In the particular case of the TCR, receptor engagement by its natural ligands results in down-regulation of TCR-CD3 cell surface expression (11–14), which is a critical event intimately associated with TCR signaling and T-cell activation (14). Different molecular mechanisms have been proposed to account for the down-modulation of ligated TCR complexes. Most studies support the position that TCR ligation results in a significant increase of the TCR internalization rate followed by the degradation of the internalized complex (15, 16). However, TCR-CD3 complexes are continuously internalized and recycled back to the cell surface in nonstimulated T cells (17, 18), suggesting that constitutive TCR recycling on resting T cells has to be affected by TCR ligation. In this regard, Wiest and co-workers (19) have recently proposed that TCR engagement has little effect on the TCR internalization rate; rather, it prevents TCR recycling back to the cell surface by inducing the intracellular retention of ligated complexes and their degradation by lysosomes and proteasomes.

In sharp contrast to the TCR, pre-TCR signaling occurs apparently without any need for ligation (5, 6). This concurs with the finding that the pre-TCR spontaneously clusters and localizes on the cell surface into lipid rafts (20, 21), in a manner similar to that found for the $\alpha\beta$ TCR following ligand binding (22, 23). These findings support the view that surface pre-TCR

* This work was supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF 97-0161 and SAF2001-1629), Dirección General de Enseñanza Superior (PB97-1194), Comunidad de Madrid (08.3/0021/2000), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 00/1044), and Fundación Eugenio Rodríguez Pascual and also by an institutional grant to the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” from Fundación Ramón Areces. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[‡] Present address: Lymphocyte Interaction Laboratory, Cancer Research, UK, 44 Lincoln's Inn Fields, P. O. Box 123, London WC2A 3PX, United Kingdom.

[§] Both authors contributed equally to this work.

[¶] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-397-8076; Fax: 34-91-397-8087; E-mail: mtoribio@cbm.uam.es.

¹ The abbreviations used are: TCR, T cell receptor; pT α , pre-TCR α ; Cy, cytoplasmic; mAb, monoclonal antibody; ChTCR, chimeric TCR; BFA, brefeldin-A; GFP, green fluorescence protein; mAb, monoclonal antibody; PKC, protein kinase C; PTK, protein tyrosine kinase.

complexes are constitutively activated without any need for ligation (20) and raise the question of what is the intracellular fate of such "activated" pre-TCR complexes. In this study, we have analyzed the dynamics of pre-TCR-CD3 cell surface expression and down-modulation in unstimulated pre-T cells and show that, similar to ligated TCR complexes, surface pre-TCR complexes are continually and rapidly endocytosed and degraded in the absence of extracellular ligation but do not recycle back to the cell surface. Moreover, we show that cell-autonomous pre-TCR down-modulation depends on the pT α cytoplasmic tail. The possibility that constitutive endocytosis and degradation of the pre-TCR is a self-safe mechanism responsible for its limited expression on the cell surface is discussed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines and Transfectants—The α wt and α /CypT α stable transfectants were derived as described elsewhere (9) from the pre-T cell line SUP-T1, which expresses an endogenous TCR β (V β 1) chain and the pT α chain but lacks TCR α . Briefly, SUP-T1 cells were transfected, respectively, either with full-length cDNAs encoding a conventional TCR α (Va12.1) chain or with a TCR α /pT α chimeric construct in which the Cy domain of TCR α was replaced by the equivalent domain of pT α (CypT α). G418-selected transfectants were grown in RPMI 1640 (Bio-Whittaker) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen). Likewise, TCR ζ -GFP stable transfectants were derived from SUP-T1 cells transfected with a plasmid encoding a COOH-terminal fusion protein of the TCR ζ chain with the green fluorescence protein (GFP). The TCR ζ -GFP fusion was performed by PCR amplification of a complete TCR ζ chain cDNA (kindly provided by Dr. B. Alarcón, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain) with the sense 5'-CGC GCG CCC GGG ATG AAG TGG AAG GCG CTT-3' and antisense 5'-GCG CGC CCG GGC CCC GCG AGG GGG CAG GGC-3' primers followed by digestion and ligation into the *Sma*I site of the pEGFP-N1 plasmid vector (Clontech). Pre-TCR surface expression levels analyzed on 48 selected TCR ζ -GFP clones were similar to those on parental SUP-T1 cells.

Internalization and Recycling Assays—SUP-T1 cells and α wt, α /CypT α , and TCR ζ -GFP stable transfectants were cultured ($5-8 \times 10^5$ /ml) in 24-well plates (Costar) either in the absence or presence of cycloheximide (40 μ g/ml, Calbiochem), brefeldin-A (1 μ g/ml, Sigma), phorbol 12-myristate 13-acetate (10 ng/ml, Calbiochem), and/or PP2 (2 μ M, Calbiochem). At different time points, surface expression of the endogenous pre-TCR was analyzed by flow cytometry (EPICS XL Coulter Corp.) with phycoerythrin-labeled anti-human TCR β -V β 1 (Endogen) or anti-CD3 ϵ (BD Biosciences) mAbs. Surface levels of the conventional TCR α -TCR β (TCR) or the chimeric TCR α /CypT α -TCR β (ChTCR) receptors expressed respectively on α wt and α /CypT α transfectants was analyzed with the anti-TCR $\alpha\beta$ mAb BMA031 (Behringwerke AG) plus phycoerythrin-labeled F(ab')₂ goat anti-mouse IgG (Caltag Laboratories). The percentage of surface expression at the indicated time points was determined from the mean fluorescence values of treated cells using the untreated controls as reference. Background values were determined with isotype-matched irrelevant antibodies.

Immunoprecipitation and Anti-TCR ζ Immunoblotting—Immunoprecipitation and immunoblotting were performed as described previously (9). In brief, cells were cultured as described above in the presence or absence of cycloheximide (40 μ g/ml) with or without inhibitors of lysosomal degradation (NH₄Cl, 40 mM, Merck; or chloroquine, 50 μ M, Sigma) or a proteasome inhibitor (lactacystin, 20 μ M, Sigma) for 8 h. Then, cells (5×10^6 /immunoprecipitation) were washed in 1 \times PBS, lysed with 1% Brij 96-containing lysis buffer and immunoprecipitated as described (9) with either anti-TCR α (α F1, Endogen) or anti-CD3 ϵ (UCHT-1, ATCC AN 1009425) mAbs. Immunoprecipitated proteins were resolved by 12% SDS-PAGE under nonreducing conditions and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (ImmobilonTM-P, Millipore). Blots were probed with the anti-human TCR ζ rabbit antiserum 448 (kindly provided by Dr. B. Alarcón) plus horseradish peroxidase-labeled polyclonal donkey anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences) and then developed using ECL Lumi-Light^{PLUS} (Roche Molecular Biochemicals). Densitometric analysis was performed with a Bioimaging BAS 1500 (Fujifilm).

Surface Biotinylation, Immunoprecipitation, and Immunoblotting—Cells (10^7 /ml) either untreated or pretreated for 2 h with 50 μ M chloroquine, 20 μ M lactacystin, or 1 μ M epoxomicin (Calbiochem) were

washed three times in complete 1 \times PBS at 4 °C and labeled with 0.5 mg/ml Sulfo-NHS-biotin (Pierce) in complete 1 \times PBS for 30 min on ice. Excess biotin was eliminated by washing the cells three times with 10 mM L-lysine (Sigma) in 1 \times PBS. Then, cells were cultured ($5-10 \times 10^6$ /ml) in the absence or presence of the indicated lysosome or proteasome inhibitors. At each time point, cells (20×10^6 /immunoprecipitation) were washed with 1 \times PBS, lysed with 1% Brij, and immunoprecipitated as described above with the UCHT-1 or SP-34 (kindly provided by Dr. B. Alarcón) anti-CD3 ϵ mAb. The immunoprecipitates were resolved by 12% SDS-PAGE under nonreducing conditions, and blots were probed with streptavidin-horseradish peroxidase (Pierce) and revealed by the ECL method. When indicated, blots were stripped and reprobed with the 448 anti-TCR ζ antiserum or an anti- α -tubulin mAb (Sigma) as above.

Confocal Microscopy and Colocalization Analysis—Confocal microscopy was performed essentially as described previously (9). Cells were adhered to poly-L-lysine (Sigma)-precoated coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at 4 °C, and stained at the cell surface with an anti-CD4 mAb (BD Biosciences). For intracellular staining, fixed cells were permeabilized with a commercial lysing solution (BD Biosciences) and stained with the anti-CD63 mAb TEA3/18 (VI International Leukocyte Typing Workshop), kindly provided by Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). Rhodamine Red X-coupled goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) was used as the second-step reagent for both surface and cytoplasmic staining. Samples were examined under a confocal microscope (Radiance 2000, Bio-Rad Laboratories) coupled to an Axiovert S100TV inverted microscope (Zeiss). Serial optical sections were recorded at 0.3–0.5 μ m intervals with a 63 \times lens under an optimal iris setup. Colocalization analyses were performed using Metamorph, version 5.03, software (Universal Imaging).

RESULTS

Surface Pre-TCR-CD3 Complexes Are Continually Internalized but Do Not Recycle Back to the Cell Surface—To study the dynamics of pre-TCR cell surface expression, we used a human pre-T cell line, SUP-T1, which has been shown to display low pre-TCR surface levels as found on primary human pre-T cells (Ref. 9 and Fig. 1A). The relative contribution of synthesis and secretion of new chains as compared with internalization and recycling of expressed ones to actual pre-TCR-CD3 surface levels was explored by comparative cycloheximide or brefeldin-A (BFA) treatment, as described recently for the mature TCR-CD3 complex (19). Pre-TCR surface expression was measured with an anti-TCRV β 1 mAb (9). The dynamics of TCR-CD3 surface expression was analyzed for comparison in the same cellular environment, namely SUP-T1 cells stably transfected with a TCR α chain (α wt transfectants), which co-expressed the conventional TCR $\alpha\beta$ -CD3 complex (>99% TCR $\alpha\beta$ ⁺) together with the endogenous pre-TCR (Ref. 9, and Fig. 1A). The results confirmed that, as described (19), the mature surface TCR-CD3 was relatively synthesis-independent, that is, surface TCR-CD3 expression levels remained essentially stable within the studied 12-h time period (Fig. 1C). Therefore, mature TCR complexes are long-lived on α wt transfectants. As reported (19), the effect of BFA on TCR expression was very different from that of cycloheximide and resulted in a partial reduction of TCR membrane levels (Fig. 1A), which fell rapidly during the first 2 h of treatment (about 30% reduction) and remained low (50% of control levels) for 8 h thereafter (Fig. 1B). Because surface expression of the mature TCR was found independent of newly synthesized complexes, this reduction in TCR surface levels cannot be due to the reported BFA-induced blockade of the anterograde transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex (24, 25). Rather, it may be caused by the documented capacity of BFA to induce tubulation and fusion of the trans-Golgi network with early endosomes, which, although previously reported to leave cycling between plasma membrane and endosomes of certain molecules such as transferrin unperturbed (24), has recently been shown to affect the endocytic transport of the TCR (19, 26). Therefore, our data

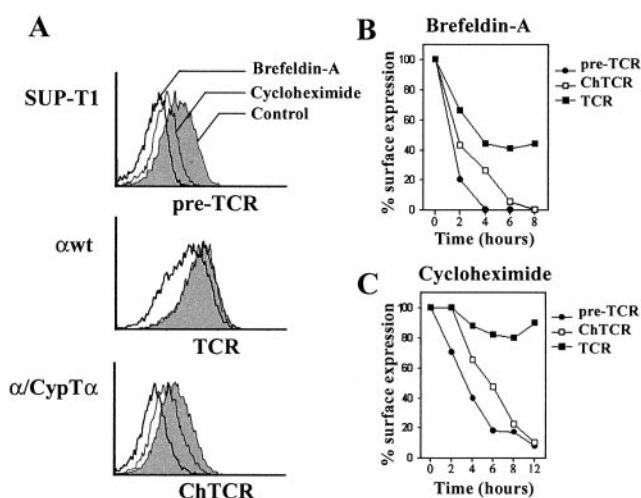


FIG. 1. Surface pre-TCR and chimeric TCR-pT α (ChTCR) complexes containing the pT α cytoplasmic domain are constitutively internalized but do not recycle back to the cell surface. A, SUP-T1 untransfected cells or cells stably transfected with a TCR α (α wt) or with a chimeric α /CypT α chain (α /CypT α) were treated for 6 h with cycloheximide (thin line) or brefeldin-A (thick line) or were left untreated (shaded histogram). Pre-TCR surface expression on SUP-T1 cells was determined by flow cytometry with a phycoerythrin-labeled mAb against the endogenous TCR β (V β 1) chain. Surface expression of TCR and ChTCR complexes on α wt and α /CypT α transfectants, respectively, was assessed with the BMA031 mAb against monomorphic determinants of human TCR $\alpha\beta$ heterodimer. The effect of brefeldin-A (B) and cycloheximide (C) on the expression levels of the endogenous pre-TCR on SUP-T1 cells, the TCR $\alpha\beta$ on α wt transfectants, and the ChTCR on α /CypT α transfectants was analyzed by flow cytometry at the indicated time points, as described in A. The percentage of surface expression was determined from the mean fluorescence values of treated cells, using the untreated controls as reference. Results are representative of four independent experiments.

indicate that TCR-CD3 complexes expressed on SUP-T1 α wt transfectants are continually internalized and recycled back to the cell surface and thus behave as conventional TCR-CD3 complexes on resting T cells (19).

In sharp contrast to the TCR, surface expression of the pre-TCR was dramatically affected by cycloheximide, indicating that it is dependent on newly synthesized complexes. Pre-TCR levels fell to less than 20% of control levels after 6 h of treatment and remained essentially undetectable after 12 h (Fig. 1C). BFA also induced a rapid and marked decrease on pre-TCR surface expression (80% after 2 h of treatment), which resulted in the down-modulation of the complex (Fig. 1, A and B). These data suggest that pre-TCR-CD3 complexes are continually internalized from the surface of SUP-T1 pre-T cells, with internalization rates that are apparently higher than those for the TCR-CD3. Surprisingly, however, endocytosed pre-TCR-CD3 complexes do not recycle back to the cell surface.

The pT α Chain Cytoplasmic Domain Is Responsible for the Impaired Recycling of the Pre-TCR-CD3 Complex—Because the pre-TCR and TCR are co-expressed on α wt transfectants, the differential intracellular fate of the two complexes cannot be cell type-dependent but, rather, is structure-dependent (*i.e.* the substitution of pT α in the pre-TCR with TCR α in the TCR). To uncover the structural properties of pT α that are responsible for the impaired recycling of the endocytosed pre-TCR, TCR α /pT α chimeric constructs involving distinct pT α and TCR α domains were stably transfected into SUP-T1 cells (9), and the surface expression dynamics of the resulting ChTCR was analyzed by flow cytometry. Particularly, we focused on α /CypT α chimeric constructs in which the Cy domain of TCR α was replaced by the equivalent domain of pT α . As shown Fig. 1A, the effects of BFA and cycloheximide on surface expression of

the resulting α /CypT α -TCR β ChTCR, measured with an anti-TCR $\alpha\beta$ mAb, were equivalent to those observed on endogenous pre-TCR expression. BFA induced a significant reduction of ChTCR expression levels after 2 h, which was followed by the complete loss of the complex after 6 h of treatment (Fig. 1, A and B), and cycloheximide treatment also resulted in ChTCR down-modulation (Fig. 1C). These data indicate that the pT α Cy domain actively mediates impaired recycling of the pre-TCR-CD3 complex to the cell surface without the need of ligand binding.

TCR ζ Chains Associated to Internalized pre-TCR and ChTCR Complexes Are Degraded Intracellularly—To investigate the mechanisms that could account for the impaired return of endocytosed pre-TCR (and ChTCR) complexes to the cell surface, we followed the intracellular fate of pre-TCR-associated TCR ζ chains in SUP-T1 cells stably transfected with a plasmid encoding a COOH-terminal fusion protein of the TCR ζ chain with the green fluorescence protein (ζ -GFP). As shown in Fig. 2A for one representative ζ -GFP⁺ clone of four, flow cytometry analysis allowed us to simultaneously measure the surface levels of the pre-TCR complex and the total cellular content of the ζ -GFP protein. These studies revealed that, as shown in Fig. 1 for the parental SUP-T1 pre-T cell line, pre-TCR complexes expressed on ζ -GFP transfectants are continually internalized from the cell surface and become down-modulated after treatment with cycloheximide, BFA, or both. Kinetic analysis showed that pre-TCR down-modulation paralleled a gradual decrease of the total content of ζ -GFP when protein synthesis was blocked, so that green fluorescence became barely detectable (<20% of control expression levels) after 12 h of treatment with cycloheximide (Fig. 2B), suggesting that the ζ -GFP chimeric chains, including those associated with the internalized pre-TCR, were degraded intracellularly. In contrast, pre-TCR down-modulation was coupled with a dramatic increase of green fluorescence in BFA-treated cells, indicating that ζ -GFP protein chimeras had accumulated in the cytoplasm. More importantly, blocking of endosome to lysosome trafficking induced by BFA (24) counteracted the effect of cycloheximide and prevented the disappearance of GFP expression, which remained stable although partly reduced (\geq 60% of control levels) after 12 h (Fig. 2, A and B). Therefore, loss of green fluorescence induced by cycloheximide could be the result of selective degradation of ζ -GFP fusion proteins in lysosomes.

Supporting this possibility, confocal microscopy analysis showed that untreated ζ -GFP transfectants had low levels of surface ζ -GFP that colocalized with the membrane marker CD4 (Fig. 2C), whereas a significant amount of green fluorescence was expressed intracellularly and accumulated in the cytoplasmic structures that expressed the lysosomal marker CD63 (27). As shown in Fig. 2D a high proportion of ζ -GFP ($55 \pm 17\%$) colocalized with CD63 on different 0.2 μ m sections. According to flow cytometry data, ζ -GFP expression was sensitive to BFA treatment, so that a significant increase of green fluorescence was observed in BFA-treated cells in which ζ -GFP accumulated intracellularly and acquired a characteristic distribution in tubular structures typical of BFA-treated cells (Fig. 2E). Expectedly, no ζ -GFP expression was detected upon cycloheximide treatment (data not shown), again supporting the possibility that pre-TCR-associated intracellular TCR ζ was degraded. However, intracellular accumulation of ζ -GFP was observed when cells were treated simultaneously with cycloheximide and BFA (Fig. 2F), indicating that degradation of cytoplasmic ζ -GFP was blocked because of the impaired trafficking to lysosomes induced by BFA.

It has been shown that the primary mechanism mediating down-modulation of the TCR upon ligand binding involves

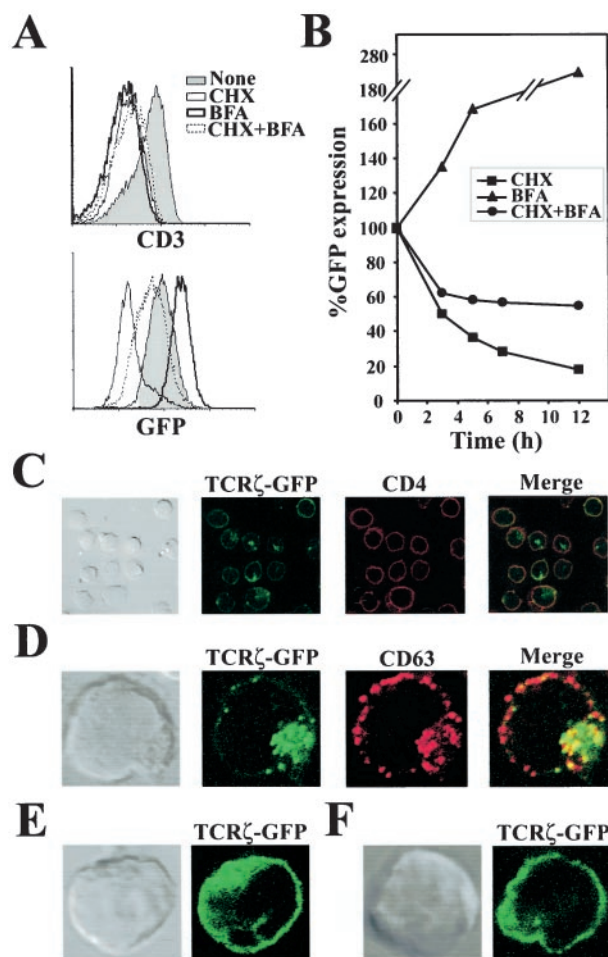


FIG. 2. The pre-TCR-associated TCR ζ chain localizes intracellularly to lysosomes. A, SUP-T1 stable transfectants homogeneous for the expression of a TCR ζ -GFP chimeric protein were cultured in the absence (shaded histogram) or presence of cycloheximide (CHX), BFA, or both (CHX+BFA) for 8 h. Two-color flow cytometry analysis was performed to measure simultaneously the surface levels of pre-TCR expression with a phycoerythrin-coupled anti-CD3 ϵ mAb (red fluorescence) and the total cellular content of TCR ζ -GFP chimeric chains (green fluorescence). B, green fluorescence analyses were performed at the indicated time points in ζ -GFP transfectants cultured in the presence of either cycloheximide, BFA, or both. Results are given relative to untreated cells. The results of confocal microscopy and colocalization analyses of ζ -GFP transfectants, either surface-stained with an anti-CD4 mAb (C) or permeabilized and stained with a mAb against the lysosomal marker CD63 (D), are shown. Rhodamine Red X-coupled goat anti-mouse Ig was used as second step reagent. ζ -GFP transfectants were treated with either BFA (E) or BFA plus cycloheximide (F) for 6 h and analyzed by confocal microscopy. Serial optical sections were captured at 0.3–0.5 μ m. The images in each panel show a single 0.2 μ m section of each cell ($n = 50$). Results are representative of at least four experiments in one of four different ζ -GFP clones.

targeting of endocytosed complexes for intracellular degradation, predominantly by lysosomes, but also by proteasomes (16, 19). To investigate whether proteasome was also involved in degradation of endocytosed pre-TCR or ChTCR complexes, biochemical studies were performed aimed at analyzing the intracellular fate of TCR ζ associated to internalized complexes in cells treated with drugs that block lysosome (NH₄Cl and chloroquine) or proteasome (lactacystin) function. None of these drugs affected surface receptor expression levels or cellular viability (data not shown). However, as shown by immunoblot analysis (Fig. 3A), they induced a significant accumulation of intracellular TCR ζ_2 dimers that were immunoprecipitated associated to the pre-TCR or the ChTCR from SUP-T1 cells or α /CypT α transfectants, respectively. In contrast, these drugs

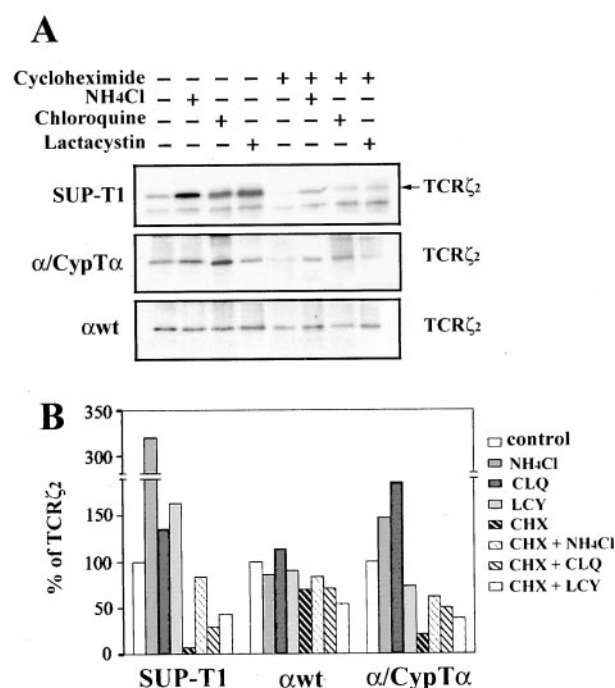


FIG. 3. TCR ζ chains associated to constitutively internalized pre-TCR and ChTCR complexes are degraded by lysosomes and proteasomes. A, SUP-T1 cells, α wt, and α /CypT α transfectants were cultured in the presence or absence of cycloheximide with or without NH₄Cl, chloroquine, or lactacystin. The total content of TCR ζ chain associated either to the pre-TCR immunoprecipitated with an anti-CD3 ϵ mAb from SUP-T1 cells or to the ChTCR or the conventional TCR $\alpha\beta$ immunoprecipitated with an anti-TCR α mAb from α wt or α /CypT α transfectants, respectively, was determined by Western blotting. B, densitometric analysis of the bands obtained in the absence (control) or presence of the indicated drugs. CLQ, chloroquine; LCY, lactacystin. The percentage of immunoprecipitated TCR ζ was determined from the band density values of treated cells, using the untreated controls as reference. Data are representative of three experiments.

did not significantly affect the levels of TCR ζ chain associated to the mature TCR complex in α wt transfectants, which is consistent with an active and selective degradation of TCR ζ_2 dimers associated with the pre-TCR and the ChTCR but not with the conventional TCR. Accordingly, degradation of TCR ζ_2 dimers associated to pre-TCR and ChTCR complexes was observed when protein synthesis was blocked with cycloheximide (Fig. 3A), but TCR ζ chain degradation was inhibited by NH₄Cl and chloroquine, and to a lesser extent, by lactacystin (see densitometric analysis in Fig. 3B). Taken together, our data provide evidence that, as shown previously for ligated TCR-CD3 complexes, constitutive internalization of unligated pre-TCR-CD3 complexes is followed immediately by TCR ζ chain degradation, mainly by lysosomes, but also by proteasomes, which prevents recycling to the cell surface. Moreover, they suggest that the pT α Cy tail is involved selectively in that process.

The pT α Cy Domain Is Sufficient to Divert the TCR α -TCR β Heterodimer from a Recycling Pathway to Intracellular Degradation—To determine whether, as shown for TCR ζ_2 dimers, internalized pT α -TCR β heterodimers are targeted for intracellular degradation, we next analyzed biochemically the intracellular fate of biotinylated surface pre-TCR-CD3 complexes. Immunoblot analysis with avidin-peroxidase of anti-CD3 ϵ immunoprecipitates confirmed that the pT α -TCR β heterodimer was rapidly degraded in SUP-T1 pre-T cells. As shown in Fig. 4A, 40% of the biotinylated heterodimers had disappeared after 90 min, and less than 30% of the input pT α -TCR β complexes remained after 4 h, as assessed by densitometric analysis (Fig.

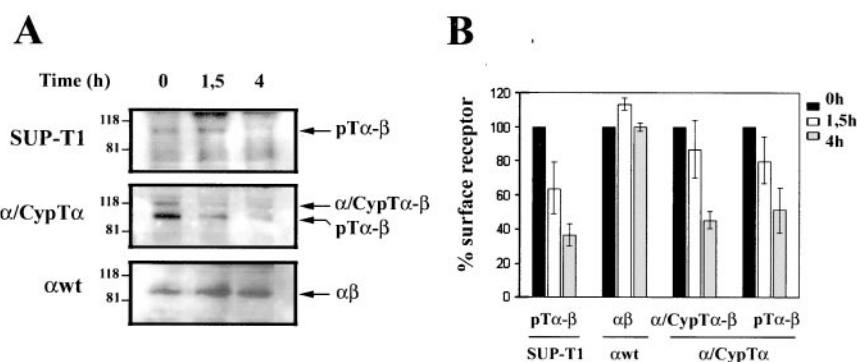


FIG. 4. Intracellular degradation of internalized pTα-TCRβ and α/CypTα-TCRβ heterodimers. A, the total content of internalized biotin-labeled surface pre-TCR (pTα-β), ChTCR (α/CypTα-β), and conventional TCR (αβ) was determined by anti-CD3ε immunoprecipitation and Western blotting with streptavidin-horseradish peroxidase at the indicated time points. Note that both the endogenous pre-TCR and the ChTCR were co-expressed and simultaneously degraded in α/CypTα transfectants. The migration positions of the molecular size standards (in kDa) are indicated on the left, and the positions of the pTα-TCRβ, α/CypTα-TCRβ, and TCRα-TCRβ heterodimers are shown on the right. B, densitometric analysis of the bands obtained at the indicated time points. The percentage of surface labeled-heterodimers was determined from the band density values obtained after 1.5 and 4 h of culture using the controls at time 0 as reference. Data represent the mean of four experiments ± S.D.

4B). In contrast, no degradation of the mature TCRαβ heterodimer was observed in αwt transfectants, in which biotinylated complexes remained stable for 4 h. Strikingly, heterodimers composed of the TCRβ chain bound to the chimeric α/CypTα chain behaved essentially as pTα-TCRβ heterodimers. Moreover, the simultaneous analysis of the ChTCR and the endogenous pre-TCR coexpressed in α/CypTα transfectants revealed that the total content of these two heterodimers decreased with identical kinetics (Fig. 4B), demonstrating that the pTα Cy tail is sufficient to determine the degradation fate of the pre-TCR components.

To investigate the intracellular degradation pathway followed by the pTα-TCRβ heterodimer, we next performed immunoblot analysis of anti-CD3ε immunoprecipitates from biotin-labeled SUP-T1 pre-T cells treated with drugs that affect either the lysosome (chloroquine) or proteasome (lactacystin and epoxomicin) function. Blotting with anti-α-tubulin was used as an internal control of protein loading (Fig. 5A). These studies revealed that about 70% of the biotinylated pTα-TCRβ heterodimers was lost after a 6-h chase as assessed by densitometric analysis (Fig. 5B). Surprisingly, a complete inhibition of the degradation of pTα-TCRβ heterodimers was observed in cells treated with lactacystin, a degradation was likewise sensitive to epoxomicin, two specific and irreversible proteasome inhibitors, whereas a weak inhibitory effect was observed after a 6-h chase in the presence of the lysosome inhibitor chloroquine. Therefore, although these data can not rule out the possibility that a proportion of the pTα-TCRβ heterodimers is degraded in lysosomes, they are consistent with a prominent role for the proteasome in the constitutive degradation of the internalized pTα-TCRβ heterodimers.

Molecular Mechanisms Involved in Constitutive Pre-TCR Down-regulation—Phosphorylation of the cytoplasmic tail of CD3γ by PKC is the mechanism responsible for constitutive TCR internalization in unstimulated T cells (28). Therefore, we analyzed whether constitutive pre-TCR internalization in unstimulated pre-T cells is also PKC-dependent. However, no effects on surface pre-TCR levels were observed after treatment of SUP-T1 cells with doses of phorbol 12-myristate 13-acetate, which induced 60% down-regulation of the mature TCR in αwt transfectants. Neither was ChTCR down-modulation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate in α/CypTα transfectants even after 2 h of treatment (Fig. 6A). These data, together with the fact that bisindolylmaleimide and Ro-31-7549, two specific PKC inhibitors, did not affect pre-TCR surface expression (data not shown), suggest that PKC is not involved in the constitutive internalization of the pre-TCR.

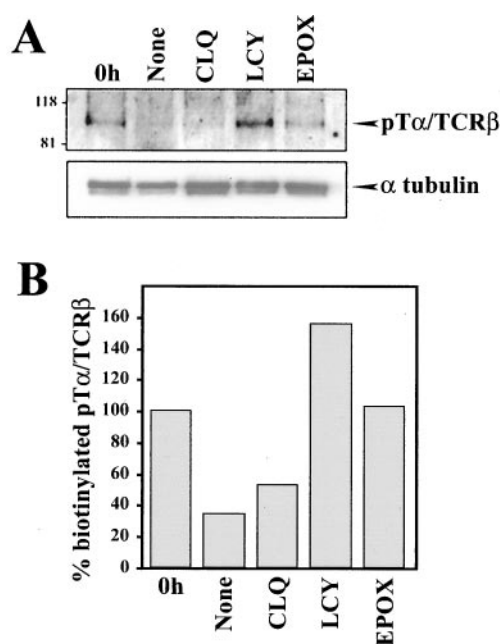


FIG. 5. Proteasome-dependent degradation of internalized pTα-TCRβ heterodimers. A, the total content of internalized biotin-labeled surface pre-TCR (pTα-TCRβ) was determined by anti-CD3ε immunoprecipitation and Western blotting with streptavidin-horseradish peroxidase in SUP-T1 cells after a 6-h chase in the presence or absence of either chloroquine (CLQ), lactacystin (LCY), or epoxomicin (EPOX). Blots were subsequently stripped and reprobed with an anti-α-tubulin mAb for control loading. B, a relative densitometric analysis of the immunoblot shown in A is displayed. Data are representative of three experiments.

An intriguing possibility is that protein tyrosine kinases (PTK) such as Lck, which might play a key role in cell-autonomous signaling through the pre-TCR (20) could participate in its down-regulation, as shown for engaged TCR-CD3 complexes (29). To address this possibility, we analyzed the effects of the *src* family (Lck/Fyn) PTK inhibitor PP2 on surface pre-TCR expression. As shown in Fig. 6B, inhibition of *src* kinases resulted in increased expression levels of the pre-TCR and the ChTCR in SUP-T1 and α/CypTα transfectants, respectively. In contrast, PP2 treatment had no effect on the expression levels of the mature TCR in Jurkat T cells (data not shown), although some increase in TCR expression was observed in αwt transfectants. To assess whether the increase in surface pre-TCR levels upon Lck/Fyn inhibition could represent a blockade in

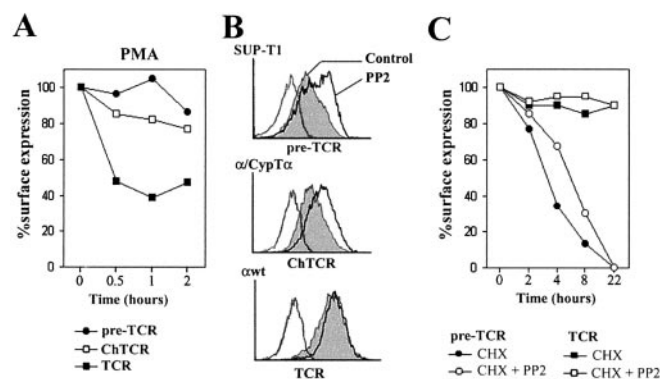


FIG. 6. Down-modulation of surface pre-TCR and ChTCR is independent of PKC but partly dependent on *src* kinase activity. A, SUP-T1 cells, α wt, and α CypT α transfectants were cultured in the absence or presence of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and analyzed by flow cytometry for receptor surface expression at the indicated time points as described in the legend for Fig. 1. B, cells were cultured overnight in the absence (shaded histogram) or presence of PP2 (thick line) and then analyzed for receptor surface expression as described in A. Background values (thin line) were determined by staining with isotype-matched irrelevant Abs. C, SUP-T1 cells and α wt transfectants were cultured in the presence of cycloheximide (CHX) with or without PP2 and analyzed at the indicated time points for receptor surface expression as described in A. The percentage of surface expression was determined from the mean fluorescence values of treated cells using the untreated controls as reference. Results are representative of three independent experiments.

both pre-TCR internalization and degradation, we next analyzed the kinetics of pre-TCR down-regulation in cycloheximide-treated SUP-T1 pre-T cells, with or without PP2. As shown in Fig. 6C, inhibition of *src* kinases consistently delayed, but could not block, the constitutive internalization and down-regulation of the pre-TCR. Therefore, mechanisms involving phosphorylation by *src* kinases are partially, but not fully, responsible for constitutive pre-TCR down-regulation.

DISCUSSION

In this study, comparative analyses on the dynamics of human pre-TCR and TCR cell surface expression and down-modulation revealed striking differences in the behavior and intracellular fate of unligated TCR and pre-TCR complexes. We have shown that TCR-CD3 complexes expressed on SUP-T1 cells, upon transfection with TCR α , are constitutively internalized and recycled back to the cell surface in the absence of ligand binding, and thus behave as conventional unligated TCR complexes on resting mature T cells (17–19). In contrast, pre-TCR complexes expressed on unstimulated SUP-T1 pre-T cells are continually and rapidly endocytosed but do not recycle back to the cell surface. As reported for TCR complexes internalized following antigenic stimulation (16, 19), we show here that intracellular degradation is the mechanism responsible for the impaired recycling of pre-TCR in unstimulated pre-T cells. Strikingly, we found that ζ chain dimers associated to the internalized pre-TCR are sorted for degradation in lysosomes and proteasomes and thus follow the intracellular fate of TCR- ζ chain complexes internalized following antigenic stimulation (16, 19), whereas evidence is provided that the proteasome plays a prominent role in the constitutive degradation of the internalized pT α -TCR β heterodimers. In this regard, it is worth noting that, as observed upon TCR ligation, internalized ζ chains associated with the unligated pre-TCR are found mostly in a phosphorylated state, a characteristic event associated with T cell activation (30). Therefore, the human pre-TCR complex behaves constitutively as an activated TCR without any need for ligand binding. After submission of this manuscript, Panigada *et al.*

(31) provided evidence of constitutive pre-TCR internalization and degradation in the mouse. Our results extend the peculiar behavior of the pre-TCR to the human, and map it to the cytoplasmic tail of the pT α chain by comparison with TCR α , which does not share this capacity.

Ligand-independent activation of the pre-TCR has recently been proposed to result from its constitutive co-localization in membrane rafts with signaling molecules, such as Lck (20), which may trigger cell-autonomous activation of proximal signaling including CD3 ϵ and Zap70 phosphorylation in a manner similar to that observed for the ligated $\alpha\beta$ TCR (22, 23). Such a particular membrane distribution might depend on the unique biochemical structure of the pre-TCR. Particularly, it was proposed that palmitoylation of the conserved juxtamembraneous cysteine residue of the pT α Cy domain might be required for the cell-autonomous raft localization of the pre-TCR (20). However, a very recent study has proved that this is not an essential component for endowing the murine pre-TCR with cell-autonomous signaling capability (32). Although this finding might support the current view that the Cy domain of the murine pT α molecule is dispensable for pre-TCR function, the same study provides direct evidence that the COOH-terminal proline-rich domain of the murine pT α Cy tail plays a crucial role in pre-TCR signaling and T cell development (32). This finding supports our proposal that the Cy tail of the human pT α molecule is an essential component of pre-TCR function (9) and concurs with the present finding that the pT α Cy tail is sufficient to confer constitutive internalization and degradation properties to the conventional TCR. It is thus likely that the same mechanisms involved in ligand-induced TCR signaling and down-regulation could control the pre-TCR-CD3 intracellular fate. Accordingly, phosphorylation of CD3 γ by PKC, which is currently believed to control the internalization and recycling of unligated TCR complexes but not ligand-induced TCR down-modulation (11, 28), does not seem to play a role in pre-TCR down-modulation. Regarding the potential role of PTKs involved in TCR signaling such as Lck and Fyn in TCR down-regulation, the available data support the view that down-regulation of engaged TCR complexes involve both PTK-dependent and -independent mechanisms, which are most likely controlled by the concentration of ligand and final receptor occupancy (11, 13, 30). Because pre-TCR internalization was found to be only partly dependent on *src* kinase activity, the situation may be equivalent to that reported for the TCR at maximal receptor occupancy (13).

Alternatively, it can be proposed that constitutive internalization and degradation of the pre-TCR depends on unique endocytosis and/or degradation motifs. In this regard, the CD3 and TCR ζ components shared by pre-TCR and TCR display internalization/sorting motifs of both the dileucine- and the tyrosine-based types, which could mediate clathrin-dependent internalization and intracellular sorting to degradation (reviewed in Ref. 11). Interestingly, a consensus tyrosine-based motif (...²²⁶YPTC²²⁹...) exists within the Cy domain of the human pT α molecule as well, which could become cell-autonomously exposed in the activated pre-TCR conformation to fulfill both the internalization and degradation functions. It is also possible that association of the pre-TCR into lipid rafts could regulate a constitutive clathrin-independent endocytic pathway similar to that recently described for the interleukin-2 receptor (33). Whatever the mechanism involved, we would suggest that constitutive internalization and degradation of the pre-TCR is a key process that controls surface receptor levels and provides the cell with a self-safe mechanism to avoid sustained ligand-independent signaling through a potent, potentially oncogenic, cell growth receptor (34).

Acknowledgments—We thank Drs. R. Kurrle, B. Alarcón, M. A. Alonso, F. Sánchez-Madrid, and R. Bragado for the generous gifts of antibodies and reagents and Drs. B. Alarcón, M. A. Alonso, J. R. Regueiro, I. V. Sandoval, and E. Fernández for helpful discussions and for reading the manuscript.

REFERENCES

1. von Boehmer, H., and Fehling, H. J. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 433–452
2. Malissen, B., Ardouin, L., Lin, S.-Y., Gillet, A., and Malissen, M. (1999) *Adv. Immunol.* **72**, 103–148
3. Borst, J., Jacobs, H., and Brouns, G. (1996) *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 181–190
4. O'Shea, C. C., Thorne, A. P., Rosewell, I. R., Hayes, B., and Owen, M. J. (1997) *Immunity* **7**, 591–599
5. Jacobs, H., Iacomini, J., van de Ven, M., Tonegawa, S., and Berns, A. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 1833–1843
6. Irving, B. A., Alt, F. W., and Killeen, N. (1998) *Science* **280**, 905–908
7. Berger, M. A., Davé, V., Rhodes, M. R., Bosma, G. C., Bosma, M. J., Kappes, D. J., and Wiest, D. L. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 1461–1467
8. Van Oers, N. S. C., von Boehmer, H., and Weiss, A. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 1585–1595
9. Carrasco, Y. R., Ramiro, A. R., Trigueros, C., de Yébenes, V. G., García-Peydró, M., and Toribio, M. L. (2001) *J. Exp. Med.* **193**, 1045–1057
10. Trigueros, C., Ramiro, A. R., Carrasco, Y. R., de Yébenes, V. G., Albar, J. P., and Toribio, M. L. (1998) *J. Exp. Med.* **188**, 1401–1412
11. Alcover, A., and Alarcón, B. (2000) *Crit. Rev. Immunol.* **20**, 325–346
12. Zanders E. D., Lamb, J. R., Feldmann, M., Green, N., and Beverley, P. C. (1983) *Nature* **303**, 625–627
13. Cai, Z., Kishimoto, H., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., and Sprent, J. (1997) *J. Exp. Med.* **185**, 641–654
14. Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995) *Nature* **375**, 148–150
15. Niedergang, F., Hemar, A., Hewitt, C. R., Owen, M. J., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12839–12845
16. Valitutti, S., Müller, S., Salio, M., and Lanzavecchia, A. (1997) *J. Exp. Med.* **185**, 1859–1864
17. Krangel, M. S. (1987) *J. Exp. Med.* **165**, 1141–1159
18. Minami, Y., Samelson, L. E., and Klausner, R. D. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13342–13347
19. Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L., and Vignali, D. A. A. (2000) *Immunity* **13**, 665–675
20. Saint-Ruf, C., Panigada, M., Azogui, O., Debey, P., von Boehmer, H., and Grassi, F. (2000) *Nature* **406**, 524–527
21. Ramiro, A. R., Navarro, M., Carreira, A., Carrasco, Y. R., de Yébenes, V. G., Carrillo, G., San Millán, J. L., Rubin, B., and Toribio, M. L. (2001) *J. Immunol.* **167**, 5106–5114
22. Janes, P. W., Ley, S. C., and Magee, A. I. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 447–461
23. Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A.-M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M.-A., Chauvin, J.-P., Pierres, M., and He, H.-T. (1998) *EMBO J.* **17**, 5334–5348
24. Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, A. D. (1991) *Cell* **67**, 601–616
25. Wood, S. A., Park, J. E., and Brown, W. J. (1991) *Cell* **67**, 591–600
26. von Essen, M., Menne, C., Nielsen, B. L., Lauritsen, J. P. H., Dietrich, J., Andersen, P. S., Karjalainen, K., Odum, N., and Geisler, C. (2002) *J. Immunol.* **168**, 4519–4523
27. Metzelaar, M. J., Wijngaard, P. L., Peters, P. J., Sixma, J. J., Nieuwenhuis, H. K., and Clevers, H. C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3239–3245
28. Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A. M., and Geisler, C. (1994) *EMBO J.* **13**, 2156–2166
29. D'Oro, U., Vacchio, M. S., Weissman, A. M., and Ashwell, J. D. (1997) *Immunity* **7**, 619–628
30. Itoh, Y., Hemmer, B., Martin, R., and Germain, R. N. (1999) *J. Immunol.* **162**, 2073–2080
31. Panigada, M., Porcellini, S., Barbier, E., Hoeflinger, S., Cazenave, P.-A., Gu, H., Band, H., von Boehmer, H., and Grassi, F. *J. Exp. Med.* **195**, 1585–1597
32. Aifantis, I., Borowski, Ch., Gounari, F., Lacorazza, H. D., Nikolich-Zugich, J., and von Boehmer, H. (2002) *Nature Immunol.* **3**, 483–488
33. Lamaze, C., Dujancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001) *Mol. Cell* **7**, 661–671
34. Jacobs, H., Ossendorp, F., de Vries, E., Ungewiss, K., von Boehmer, H., Borst, J., and Berns, A. (1996) *Oncogene* **12**, 2089–2099

Biochemical Differences in the $\alpha\beta$ T Cell Receptor-CD3 Surface Complex between CD8⁺ and CD4⁺ Human Mature T Lymphocytes*

Received for publication, October 20, 2003, and in revised form, February 27, 2004
Published, JBC Papers in Press, April 1, 2004, DOI 10.1074/jbc.M311455200

David A. Zapata^{‡§}, Wolfgang W. A. Schamel[¶], Pilar S. Torres^{‡§}, Balbino Alarcón[¶],
Nineth E. Rossi^{‡¶}, María N. Navarro[¶], María L. Toribio[¶], and José R. Regueiro^{‡**}

From the [‡]Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain and the [¶]Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

We have reported the existence of biochemical and conformational differences in the $\alpha\beta$ T cell receptor (TCR) complex between CD4⁺ and CD8⁺ CD3 γ -deficient (γ^-) mature T cells. In the present study, we have furthered our understanding and extended the observations to primary T lymphocytes from normal (γ^+) individuals. Surface TCR-CD3 components from CD4⁺ γ^- T cells, other than CD3 γ , were detectable and similar in size to CD4⁺ γ^+ controls. Their native TCR-CD3 complex was also similar to CD4⁺ γ^+ controls, except for an $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2\zeta_2$ instead of an $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta_2$ stoichiometry. In contrast, the surface TCR α , TCR β , and CD3 δ chains of CD8⁺ γ^- T cells did not possess their usual sizes. Using confocal immunofluorescence, TCR α was hardly detectable in CD8⁺ γ^- T cells. Blue native gels (BN-PAGE) demonstrated the existence of a heterogeneous population of TCR-CD3 in these cells. Using primary peripheral blood T lymphocytes from normal (γ^+) donors, we performed a broad epitopic scan. In contrast to all other TCR-CD3-specific monoclonal antibodies, RW2-8C8 stained CD8⁺ better than it did CD4⁺ T cells, and the difference was dependent on glycosylation of the TCR-CD3 complex but independent of T cell activation or differentiation. RW2-8C8 staining of CD8⁺ T cells was shown to be more dependent on lipid raft integrity than that of CD4⁺ T cells. Finally, immunoprecipitation studies on purified primary CD4⁺ and CD8⁺ T cells revealed the existence of TCR glycosylation differences between the two. Collectively, these results are consistent with the existence of conformational or topological lineage-specific differences in the TCR-CD3 from CD4⁺ and CD8⁺ wild type T cells. The differences may be relevant for *cis* interactions during antigen recognition and signal transduction.

$\alpha\beta$ T lymphocytes recognize peptide-major histocompatibility complex ligands by means of a multimeric protein complex termed the $\alpha\beta$ T cell receptor (TCR)¹ CD3 complex (TCR-CD3). This structure is composed of a variable $\alpha\beta$ TCR dimer that

binds antigens and three invariant dimers (CD3 $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, and $\zeta\zeta$) that are in charge of TCR-CD3 complex transport, stabilization, and signal transduction (1). The minimum stoichiometry, therefore, is believed to be $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta_2$.

Mature CD4⁺ and CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells differ sharply in their major histocompatibility complex ligands, but their TCR-CD3 complex is believed to be qualitatively identical. The reduced $\alpha\beta$ TCR-CD3 staining levels observed in CD8⁺ T cells, relative to CD4⁺ T cells, were therefore reported as quantitative under this assumption (2). Unexpectedly, peripheral blood $\alpha\beta$ TCR-CD3 expression was shown to be more impaired in CD8⁺ than in CD4⁺ cells when CD3 γ (3, 4) or CD3 δ (5) was absent. These observations were followed by the description of conformational and biochemical differences in the TCR-CD3 complex between CD8⁺ and CD4⁺ CD3 γ deficient (γ^-) T lymphocytes (6). Biosynthetic studies showed that CD8⁺ but not CD4⁺ γ^- T cells lacked normal TCR α . Instead, the CD4⁺ γ^- T cells contained a small $\alpha\beta$ heterodimer composed of abnormally glycosylated TCR β and an abnormally small CD3-associated chain that was not recognized by TCR α -specific antibodies.

In the present study, we have extended these biochemical studies to the cell surface and provide further evidence for the existence of qualitative differences in the $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex between CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes, particularly when CD3 γ is lacking, but also in normal T cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells—Herpesvirus *saimiri*-transformed T cell lines were derived with informed consent from the peripheral blood lymphocytes (PBLs) of a healthy congenital CD3 γ -deficient (γ^-) individual or the PBLs of normal donors (γ^+) as described previously (7, 8). The T cell lines used in the experiments (DSF4, CD4⁺ γ^- ; CTRCD4, CD4⁺ γ^+ ; DSF8, CD8⁺ γ^- ; and CTO, CD8⁺ γ^+) had been cultured for 6–7 years when the experiments were performed. Cells had always been grown in parallel in 1:1 RPMI 1640 and 25 mM Hepes/Panzerin medium (from Invitrogen and Pan Biotech, Aidenbach, Germany, respectively) supplemented with 40 IU/ml human rIL-2 (Frederick Cancer Research and Development Center, NCI, National Institutes of Health, Frederick, MD), 10% FCS (Flow Laboratories), and 1% glutamine (BioWhittaker, Berkshire, UK). The medium was replaced every 3–4 days. The pre-TCR-expressing cell line SupT1 was grown in RPMI 1640 and 25 mM Hepes supplemented with 10% FCS and 1% glutamine.

Human PBLs were obtained with informed consent from normal donors. Purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated immunomagnetically using standard procedures according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Purities >90% were the rule. Human postnatal thymocytes were isolated from thymus fragments removed during corrective cardiac surgery of patients aged 1 month to 4 years with informed parental consent.

TCR Labeling and Immunoprecipitation—Surface labeling (¹²⁵I and

cyclodextrin; MFI, mean fluorescence intensity; NANase, N-acetylneuraminidase; PBL, peripheral blood lymphocyte.

* This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2002-3247) and the Comunidad Autónoma de Madrid (21/01) (to J. R. R.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by Comunidad Autónoma de Madrid.

¶ Supported by the Universidad de Los Andes (Venezuela).

** To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-394-1642; Fax: 34-91-394-1641; E-mail: regueiro@med.ucm.es.

¹ The abbreviations used are: TCR, T cell receptor; BN, blue native; FCS, fetal calf serum; mAb, monoclonal antibody; M β CD, methyl- β -

biotin) and precipitation experiments were performed as described in Refs. 6 and 7. Cells were ^{125}I -labeled using the lactoperoxidase method. Samples were lysed in Nonidet P-40 (Sigma)-containing lysis buffer (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM iodoacetamide, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) or in digitonin (or Brij96)-containing lysis buffer (1% digitonin (or Brij96), 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 8 mM iodoacetamide). Supernatants, hereafter referred to as lysates, were collected and transferred to new tubes. The lysates were precleared twice with Sepharose beads (Amersham Biosciences) containing 1% Nonidet P-40 or 1% digitonin (or Brij96, depending on the detergent used for the lysis), followed by a 2-min centrifugation at $12,000 \times g$ in an Eppendorf centrifuge at 4°C . The precleared supernatants were subsequently immunoprecipitated for 1 h and 30 min at 4°C with 5–10 μl of an TCR α - or TCR β -specific mAb (αF1 and βF1 , respectively, from Endogen, Cambridge, MA) or 0.5 ml of the CD3-specific mAb OKT3 (CD3 $\epsilon/\gamma\delta$ -specific, generously donated by Dr. Bent Rubin, Centre Hospitalier Universitaire de Purpan, Toulouse, France) coupled to protein G-Sepharose beads (Amersham Biosciences). For control immunoprecipitations, 5–10 μl of W6/32 mAb supernatant (a gift from Dr. E. Martínez-Naves, Immunología, Universidad Complutense) coupled to protein-G-Sepharose beads were used. The beads were afterward washed 5 times in lysis buffer.

Endo- β -N-acetylglucosaminidase H and N-glycosidase F (Roche Applied Science) treatments were done as described (6, 7). Finally, samples were resuspended in Laemmli sample buffer and boiled for 5 min before a short spin at $12,000 \times g$. SDS-PAGE was performed on 10% polyacrylamide gels and analyzed by autoradiography.

Confocal Microscopy— 5×10^6 cells were washed twice in phosphate-buffered saline/1% bovine serum albumin and adjusted to a final concentration of $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ in the same solution. 2.5×10^4 cells were dropped on non-treated glass slides by cytocentrifugation at 400 rpm for 3–4 min in a Cytospin 3 cytocentrifuge (Shandon, Pittsburgh, PA). Samples were air-dried and then fixed in acetone at room temperature for 5 min. Slides were again air-dried and subsequently stained with the corresponding mAb. Briefly, 100 μl of either TCR α - or TCR β -specific mAb (1:5 dilution) were dispensed onto the fixed cells, and the slides were incubated at room temperature in a wet box for 40 min. Samples were washed twice in phosphate-buffered saline, dried carefully, and stained with a mouse IgG-specific Cy5-conjugated secondary mAb (100 μl , 1:200 dilution) for another 40 min in a wet box. After two more washes with phosphate-buffered saline, samples were dried and stained (40 min, wet box) with either CD4- or CD8 α -specific fluorescein isothiocyanate-conjugated mAb from Pharmingen (100 μl , 1:2 dilution). After two final washes, a drop of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) mounting medium was added to the slides, and cells were analyzed under a Bio-Rad MRC-1024 confocal microscope.

Flow Cytometry—TCR-CD3-associated epitopes were analyzed in thymocytes, PBLs, or *H. saimiri*-transformed T cells by three-color flow cytometry as described elsewhere (30 min, 4°C ; Ref. 8). PBLs were studied either before or 12 h after phytohemagglutinin stimulation (Sigma; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Ref. 9). Briefly, 5×10^5 cells were stained with CD3- or TCR-specific mAb, washed twice in phosphate-buffered saline/1% FCS, and stained with a fluorescein isothiocyanate-conjugated panT $\gamma\delta$ mAb and a PC5-conjugated CD4- or CD8-specific mAb so that lineage-dependent comparisons could be established within $\gamma\delta^-$ CD4 $^+$ - or $\gamma\delta^-$ CD8 $^+$ -gated PBL subsets. Other PBL subsets were defined and gated using the appropriate mAb (CD45RA, CD45RO, or CD69). Intrathymic, mature, single positive subsets were gated as CD4 $^+$ CD8 $^-$ CD3 $^+$ or CD4 $^+$ CD8 $^-$ CD1a $^-$ and CD4 $^-$ CD8 $^+$ $\gamma\delta^-$ or CD4 $^-$ CD8 $^+$ CD1a $^-$ $\gamma\delta^-$, respectively, or analyzed after magnetic sorting using CD1a-coated microbeads (Miltenyi Biotec). For comparative stainings, the mean fluorescence intensity (MFI) was used.

The mAbs used in the study were UCHT1 (CD3 $\epsilon/\gamma\delta$), CD4, CD8, and CD45RO from Immunotech (Marseille, France); X35 (CD3 ϵ) from D. Bourel (Centre Régional de Transfusion Sanguine, Rennes, France); 2Ad2 (CD3 ϵ) and RW2-8C8 (CD3 ϵ) from E. L. Reinherz (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA); SPV.T3b (CD3 ϵ) from J. E. de Vries (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands); F101.01 (CD3) hybridoma supernatant from Dr. Bent Rubin; Cris7 (CD3 ϵ) from R. Vilella (Hospital Clínic, Barcelona, Spain); WT31 (CD3 ϵ), Leu4 (CD3 $\epsilon/\gamma\delta$), SP34 (CD3 ϵ), CD8, CD69, CD45RA, and CD43 from BD Biosciences; BMA031 (TCR $\alpha\beta$) from Caltag or Beckman Coulter; CD4 and CD1a from Beckman Coulter; TS2/16 and Lia 3/2 (CD18) from C. Cabañas (Instituto de Farmacología y Toxicología, CSIC-UCM, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain); TCR δ 1 (TCR $\gamma\delta$) from T Cell Diagnostics (Boston, MA) or Caltag. For purified mAb, phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) or IgM (μ)

secondary antibodies from Caltag, Southern Biotechnology Associates, or Immunotech were used.

To selectively disrupt lipid rafts, cholesterol was removed using methyl- β -cyclodextrin (M β CD; Sigma) as described (10). M β CD was dissolved in water (0.5 M) and diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 50 mM Hepes buffer. Briefly, 2×10^6 purified PBLs were washed in RPMI 1640 and 1% FCS, treated with 10 mM M β CD for 30 min at 37°C , and then washed extensively in ice-cold RPMI 1640 and 1% FCS. Cells were then stained for cell surface marker expression by flow cytometry. WT31 and OKT3 stainings were used as negative and positive controls, respectively (11).

NANase (Sigma) treatments were done as described (12). NANase effects were controlled externally by the increased WT31 binding of a $\gamma\delta^+$ T cell line termed Peer (data not shown) and internally by the decreased binding of a CD43-specific antibody, as described (13).

Blue Native (BN)-PAGE and Western Blotting—Published methods were used for the two-step affinity purification of the TCR (14). Briefly, cells were stimulated with pervanadate and lysed with 1% digitonin lysis buffer containing sodium orthovanadate. Phosphorylated proteins were purified with 1 μg of 4G10 and 3 μl of protein G-Sepharose, washed three times, and subsequently eluted in BN buffer (500 mM ϵ -aminocaproic acid, 20 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, and 20 mM bis-Tris, pH 7) including 50 mM phenylphosphate, 1 unit of alkaline phosphatase, and 1% digitonin. Dephosphorylated TCRs were separated by BN-PAGE as described (15). Western blots were developed with the anti- ζ antiserum 448. Ferritin monomers (f1; 400 kDa), dimers (f2; 880 kDa), and trimers (f3; 1320 kDa) were included as molecular mass standards. Under these conditions, the normal dephosphorylated $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta_2$ TCR-CD3 runs at ~ 400 kDa (f1) despite the fact that the relative molecular masses of the isolated dimers add up to only 230 kDa ($90 + 50 + 50 + 40$). Therefore, shape as well as molecular mass is important in BN-PAGE gels. For antibody-based gel shift experiments, samples were pre-incubated with βF1 (TCR β) mAb or Fab fragments of SP34 (CD3 ϵ) before electrophoresis. A detailed description and analysis of the wild-type TCR by BN-PAGE has been submitted.²

RESULTS

CD4 $^+$ and CD8 $^+$ CD3 γ -deficient T Lymphocytes Express Biochemically Different Membrane $\alpha\beta$ TCR-CD3 Complexes—Natural CD3 γ -deficient (γ^-) T cells were biotinylated or radioiodinated, lysed, and immunoprecipitated with CD3-specific as well as with TCR-specific mAb and compared with normal controls (γ^+). The results showed that, in contrast to biosynthetic experiments, the amount of surface CD3-associated TCR (and ζ) proteins was very low in γ^- cells (Fig. 1A). This precluded a meaningful analysis of the TCR composition of the complex by this method. We have previously reported by immunoprecipitation that surface CD3 δ from CD8 $^+$ γ^- cells showed an impaired electrophoretic mobility in comparison with controls because of its abnormal glycosylation (Fig. 1A, right). This finding correlated with complete endo- β -N-acetylglucosaminidase H resistance (6). Therefore, we next analyzed the CD3 δ from CD4 $^+$ γ^- cells. The results demonstrated that, in contrast to CD8 $^+$ γ^- cells, the CD3 δ from CD4 $^+$ γ^- cells was similar to that from controls, both in terms of relative mobility and endo- β -N-acetylglucosaminidase H sensitivity (Fig. 1B). The direct immunoprecipitation of TCR chains showed that CD4 $^+$ γ^- cells were comparable with CD4 $^+$ γ^+ cells in terms of TCR chain composition, whereas CD8 $^+$ γ^- cells clearly lacked normal surface TCR α and TCR β chains (Fig. 2). These differences were TCR-specific, because control immunoprecipitates of major histocompatibility complex class I molecules were equivalent in all cells.

To further characterize the surface TCR chains of the mutant cells, immunofluorescence confocal analyses were performed using the same mAb. Expression of the CD4 or CD8 coreceptors was used as a positive or negative control in each cell type. The results indicated that both TCR α and TCR β chains showed normal (mostly surface) distribution and fluorescence intensities in CD4 $^+$ γ^- lymphocytes (Fig. 3). CD8 $^+$ γ^-

² W. W. A. Schamel and B. Alarcón, submitted for publication.

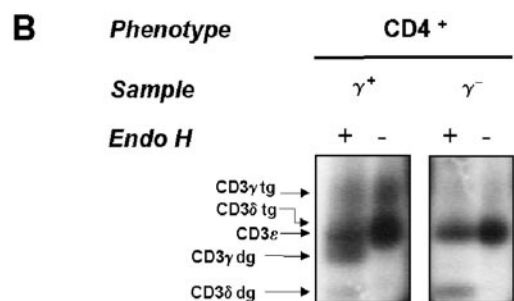
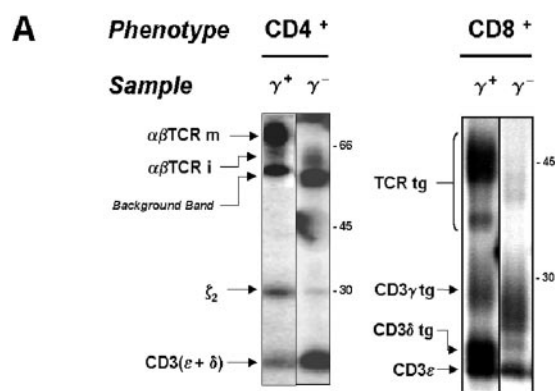


FIG. 1. Immunoprecipitation of surface-labeled $\alpha\beta$ TCR-CD3 from CD3 γ -deficient CD4⁺ and CD8⁺ T cells. A, at least 5×10^6 γ^+ and γ^- cells/lane, either CD4⁺ or CD8⁺, were surface-labeled and lysed with biotin/digitonin or ^{125}I /Brij96, respectively, and precipitated with a CD3-specific mAb before electrophoresis under reducing (right) or non-reducing (left) conditions in 10% polyacrylamide gels. Note that CD3 γ is poorly labeled by biotin. B, $5\text{--}10 \times 10^6$ CD4⁺ γ^+ and CD4⁺ γ^- cells/lane were surface-labeled, lysed in 1% digitonin-containing buffer, and digested, where indicated, with endo- β -N-acetylglucosaminidase H (*Endo H*) before electrophoresis under reducing conditions in 10% polyacrylamide gels. Positions of the expected normal proteins are indicated (*tg*, totally glycosylated; *dg*, deglycosylated). $\alpha\beta$ TCR*m* and $\alpha\beta$ TCR*i* denote the mature or immature forms of the heterodimer, respectively. TCR denotes the monomeric forms of the TCR (α or β) chains.

cells also showed normal expression of TCR β by this assay, but TCR α was hardly detectable and, when present (10–20% of cells), mostly intracellular. The discrepancy in TCR β expression by CD4⁺ γ^- cells between these data and the immunoprecipitation results (above) may be due to technical differences, such as the use of acetone for confocal analysis.

In a last set of experiments, the native surface TCR-CD3 complexes from CD4⁺ and CD8⁺ mutant cells were compared (14, 15). The results indicated that the TCR-CD3 complex from CD4⁺ γ^- T lymphocytes was similar to normal complexes from γ^+ T cells (CD4⁺, CD8⁺, or Jurkat), although with delayed electrophoretic mobility (Fig. 4A). This observation was compatible with either a different stoichiometry or a different structure (such as glycosylation or conformation changes) of the mutant complex (see “Experimental Procedures”). To distinguish between these two possibilities, antigenic shift experiments were performed. One shift indicates that there is a single chain per complex, and two shifts denote two binding sites per complex. The results indicated that the mutant TCR-CD3 complex had a normal stoichiometry when compared with that of γ^+ T cells (Jurkat, Fig. 4B, or PBL, not shown). It contained one TCR β chain (hence a single $\alpha\beta$ heterodimer) and two CD3 ϵ chains (probably representing two CD3 $\delta\epsilon$ dimers, because γ was absent). In summary, these experiments support an $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2\zeta_2$ model for the mutant TCR-CD3 complex in CD4⁺ γ^- cells, where the $\gamma\epsilon$ dimer is replaced by the analogous $\delta\epsilon$ dimer. Therefore, other types of modifications, such as glyco-

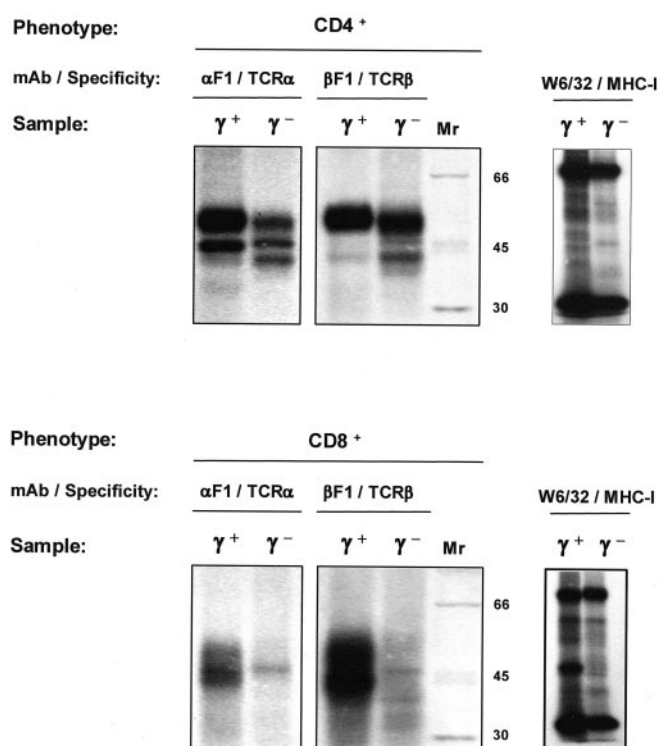


FIG. 2. Immunoprecipitation of surface-iodinated TCR chains from CD3 γ -deficient CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Equal numbers of γ^+ and γ^- cells, either CD4⁺ or CD8⁺, were surface-labeled with ^{125}I , lysed in 1% Nonidet P-40-containing buffer, and precipitated with a TCR-specific mAb (W6/32) or, as a control, a major histocompatibility complex-specific mAb (MHC-I) before electrophoresis under reducing conditions in 10% polyacrylamide gels.

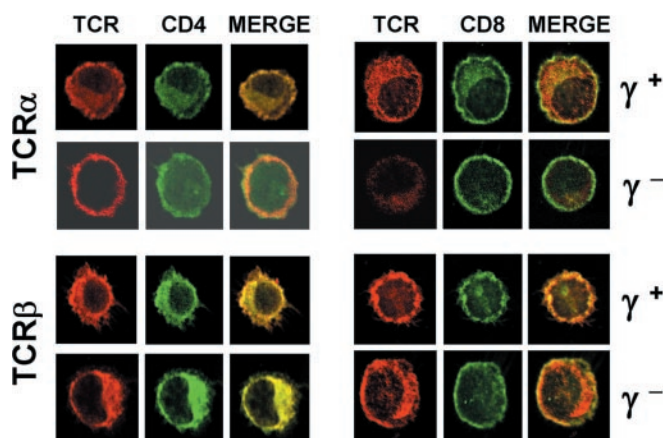
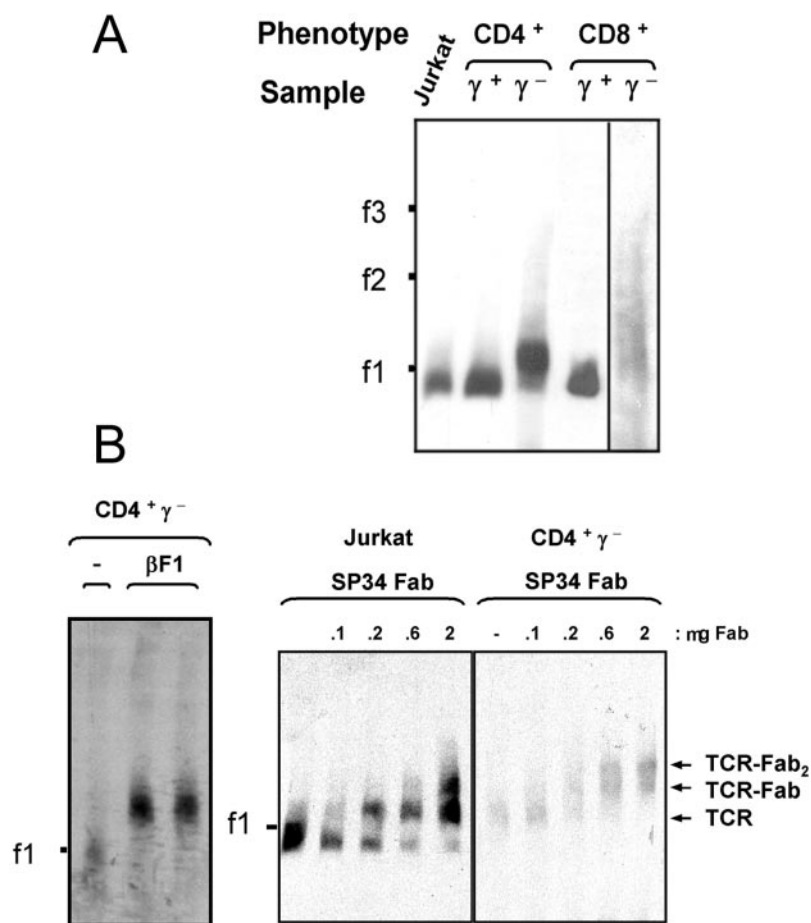


FIG. 3. Confocal analysis of TCR α and TCR β expression by CD3 γ -deficient CD4⁺ and CD8⁺ T cells. 2.5×10^4 CD4⁺ or CD8⁺ cells, both γ^+ and γ^- , were cytocentrifuged, acetone-fixed, and stained with purified TCR α - and TCR β -specific mAbs and Cy3-conjugated secondary antibodies. CD4- and CD8-fluorescein isothiocyanate stainings were included as a positive control. Cy3 and fluorescein isothiocyanate emissions were acquired simultaneously. The images show a medial optical cut of representative cells. CD4 staining was intracellular in this particular preparation.

sylation or conformation, may explain the delayed migration of the mutant complex. In sharp contrast, CD8⁺ γ^- cells expressed a very different TCR-CD3 complex as compared with their CD4⁺ γ^- counterparts. Native TCR-CD3 complexes isolated from CD8⁺ γ^- cells migrated along a broad smear, suggesting the existence of a heterogeneous population of complexes in these cells (Fig. 4A). The stoichiometry of these heterogeneous TCR-CD3 complexes could not be determined by antigenic shift due to the basal broad smear.

FIG. 4. Native surface TCR-CD3 complex analyses of CD3 γ -deficient CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells. A, equal numbers of γ^{+} and γ^{-} cells, either CD4 $^{+}$ or CD8 $^{+}$, were stimulated with pervanadate and lysed in 1% digitonin before the purification of phosphorylated proteins using anti-phosphotyrosine-immunoprecipitation. Bound proteins were eluted, dephosphorylated, and separated by BN-PAGE. Western blots were developed with anti- ζ . Ferritin monomers (f1), dimers (f2), and trimers (f3) were included as molecular weight standards. B, antibody-based gel shift assay of CD4 $^{+}$ γ^{-} or Jurkat T cells using the indicated mAbs.



From these studies we conclude that CD4 $^{+}$ γ^{-} and CD8 $^{+}$ γ^{-} cells shared a poor surface association of CD3 to TCR chains. We also conclude, by using several experimental approaches, that their surface $\alpha\beta$ TCR-CD3 complexes differed biochemically in the CD3 and the TCR components, as well as in the complete native complex.

CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ Primary T Lymphocytes Express Biochemically Different Membrane $\alpha\beta$ TCR-CD3 Complexes—Normal primary CD4 $^{+}$ T cells show higher TCR-CD3 staining levels than do CD8 $^{+}$ cells (~ 1.5 -fold with OKT3; Ref. 2). This difference was interpreted as quantitative under the assumption that the $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex is identical in both cell types. However, as shown above and in Ref. 6, the analysis of γ^{-} TCR-CD3 complexes suggested the existence of hitherto unrecognized structural differences between both cell lineages. These results prompted us to search for qualitative $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex differences in normal CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ primary T lymphocytes. To test this hypothesis, a broad epitopic scan of the TCR-CD3 complex was performed by three-color flow cytometry using several CD3- or TCR-specific mAbs within gated CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ subsets. To exclude CD8 $^{+}$ NK cells (mostly CD8 $\alpha\alpha^{+}$, which stain dull for CD8 mAb), only CD8 $^{\text{bright}}$ cells (CD8 $\alpha\beta^{+}$ T cells) were analyzed. As a control, CD18-specific mAbs were used, which stained primary CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells similarly. The data are depicted in Fig. 5A as MFI ratios of each mAb in CD4 $^{+}$ relative to CD8 $^{+}$ T cells, with representative histograms in Fig. 5B. The results showed that, for most of the mAb assayed, CD4 $^{+}$ lymphocytes stained better (MFI ratio >1.5 , Fig. 5A) than did CD8 $^{+}$ lymphocytes, as described (2). However this was not the case with two mAbs that stained CD8 $^{+}$ T cells similarly (MFI ratio = 1.2, WT31; Ref. 16) or even better (MFI ratio <1 , RW2-8C8; Ref. 17) than did CD4 $^{+}$ T cells. These observations are not consistent with the quanti-

tative interpretation but, rather, with the existence of conformational (*i.e.* qualitative) differences in the $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex between CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells.

To determine whether these conformational differences were developmentally regulated or regulated by activation (as described for activated $\gamma\delta$ T cells, 18), mature CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T lymphocytes were analyzed and compared for CD3 (and CD18) expression in four consecutive differentiation stages as follows: 1) intrathymic single positive (CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ or CD4 $^{-}$ CD8 $^{+}$) early mature T cells (gated as described under "Experimental Procedures"); 2) peripheral blood naive T cells (defined by CD45RA $^{+}$ expression, which identifies recent thymic emigrants, Ref. 19); 3) peripheral blood memory T cells (CD45RO $^{+}$); and 4) recently activated peripheral blood T cells (gated as CD69 $^{+}$ after phytohemagglutinin incubation) or constitutively activated *H. saimiri* (HVS)-transformed T cells (20). The results indicated that the increased RW2-8C8 binding of CD8 $^{+}$ as compared with that of CD4 $^{+}$ T cells was essentially independent of their activation or differentiation status, although it was more apparent in peripheral T cells (naive, memory, or activated) than in intrathymic single positive T cells (Fig. 5C). In contrast, increased UCHT1 binding of CD4 $^{+}$ T cells as compared with that of CD8 $^{+}$ T cells was clearly regulated by activation and differentiation, as it occurred only in intrathymic and naive T cells but not in memory or activated T cells. These changes were specific for the TCR-CD3 complex, as CD18 was regulated in an opposite fashion. Interestingly, equivalent UCHT1 binding of CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ memory T cells was acquired through both a decreased binding of CD4 $^{+}$ T cells and an increased binding of CD8 $^{+}$ T cells relative to their naive counterparts, whereas RW2-8C8 binding differences were unaltered by the naive/memory transition (not shown). Therefore, CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells indeed regulated their $\alpha\beta$ TCR-CD3

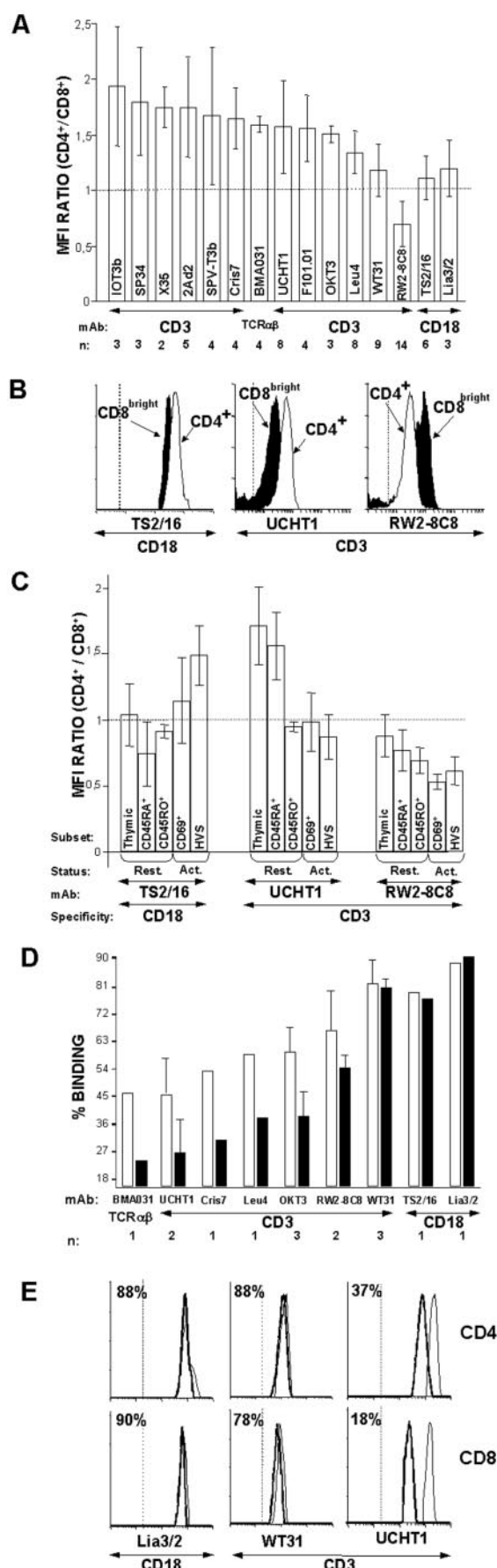


FIG. 5. Comparative cell surface TCR-CD3 expression by normal CD4⁺ and CD8⁺ peripheral blood lymphocytes and dependence on lipid raft integrity. A, MFI ratios \pm S.D. of CD4⁺ relative to

conformational differences but did so differently for each epitope, and the RW2-8C8 epitope was well conserved along mature T cell differentiation.

It has been proposed that lipid raft integrity affects the topological arrangement of the TCR-CD3 complex on the cell surface (10). Also, it is believed that a fraction of TCR-CD3 is raft-associated because of its association with the cytoplasmic portion of the CD8 (or CD4) coreceptor (21). We therefore reasoned that the conformational TCR-CD3 differences observed between CD4⁺ and CD8⁺ T cells could be due, at least in part, to the differential arrangement of lipid raft-associated surface TCR-CD3 clusters or arrays. To test this hypothesis, primary T lymphocytes were treated with M β CD and analyzed for CD3 expression within the CD4⁺ and CD8^{bright} T cell subsets using several TCR-CD3-specific mAbs (Fig. 5, D and E). M β CD disrupts lipid microdomains by extracting cholesterol from plasma membranes (22). WT31 and OKT3 were used as negative and positive controls for the TCR-CD3 complex, respectively, as described (11). Two different CD18-specific mAbs were used as additional negative controls (10). The result showed that the TCR-CD3 complex was more dependent on lipid raft integrity in CD8⁺ as compared with CD4⁺ T cells when probed with several antibodies (RW2-8C8, OKT3, Leu4, Cris7, UCHT1, and BMA031) but not with WT31 (as expected; Ref. 11). These results are consistent with the existence of more lipid raft-associated TCR-CD3 domains (or isoforms) in CD8⁺ than in CD4⁺ T cells. Interestingly, RW2-8C8 seemed to bind a relatively lipid raft-independent TCR-CD3 epitope (or isoform) in CD4⁺, which was lipid raft-dependent in CD8⁺ T cells. It was surprising to find that the lipid raft-dependent TCR-CD3-specific mAbs were those that bound CD4⁺ better than CD8⁺ T cells (compare Fig. 5, A and D).

Because the TCR-CD3 protein components are equivalent in CD8⁺ and CD4⁺ T cells, it was also possible that the conformational differences were due, in part, to glycosylation variability of the TCR-CD3 complex, as shown for $\gamma\delta$ T cells (12, 18). To test this hypothesis, primary T cells were digested with NANase and analyzed for CD3 expression within the CD4⁺ and CD8^{bright} T cell subsets using RW2-8C8 and Leu4 (Fig. 6A). Decreased binding of CD43 was used as an internal control of NANase treatment, as described (13). The results showed that NANase-treated CD4⁺ T cells became indistinguishable from CD8⁺ T cells using RW2-8C8 but not Leu4, suggesting that NANA-associated glycosylation of the TCR-CD3 components in CD4⁺ T cells partially hides (or builds) the RW2-8C8 epitope.

To further characterize the RW2-8C8 epitope, competition experiments were performed on several mature and immature T lymphocyte types using phycoerythrin-labeled Leu4 (CD3-specific) or BMA031 (framework TCR $\alpha\beta$ -specific). The results

CD8⁺ T cells with the indicated mAb in *n* independent donors. MFI ratios above or below 1 (indicated by the horizontal dotted line) reflect an increased or decreased mAb binding to CD4⁺ cells, respectively. As an invariant control, CD18/CD11b expression was evaluated in parallel with two different mAbs recognizing different epitopes of the same molecule. B, representative reactivity patterns of selected mAbs in CD4⁺ (open histograms) and CD8^{bright} (filled histograms) PBLs. Profiles are shown as the logarithm of relative fluorescence versus the number of cells. The vertical line in each panel indicates the upper limit of background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAb. C, MFI ratios as in panel A for the indicated mAb and T cell subsets from at least three independent donors (HVS, *H. saimiri*-transformed; Rest, resting; Act, activated). D, purified PBLs from *n* independent donors were treated with M β CD to disrupt rafts and analyzed for surface binding of the indicated mAbs within CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. The results are given relative to untreated cells. E, representative reactivity patterns of selected mAbs in CD4⁺ and CD8^{bright} PBLs before (thin histograms) or after (thick histograms) M β CD treatment. The numbers denote the percentage of binding as in panel D.

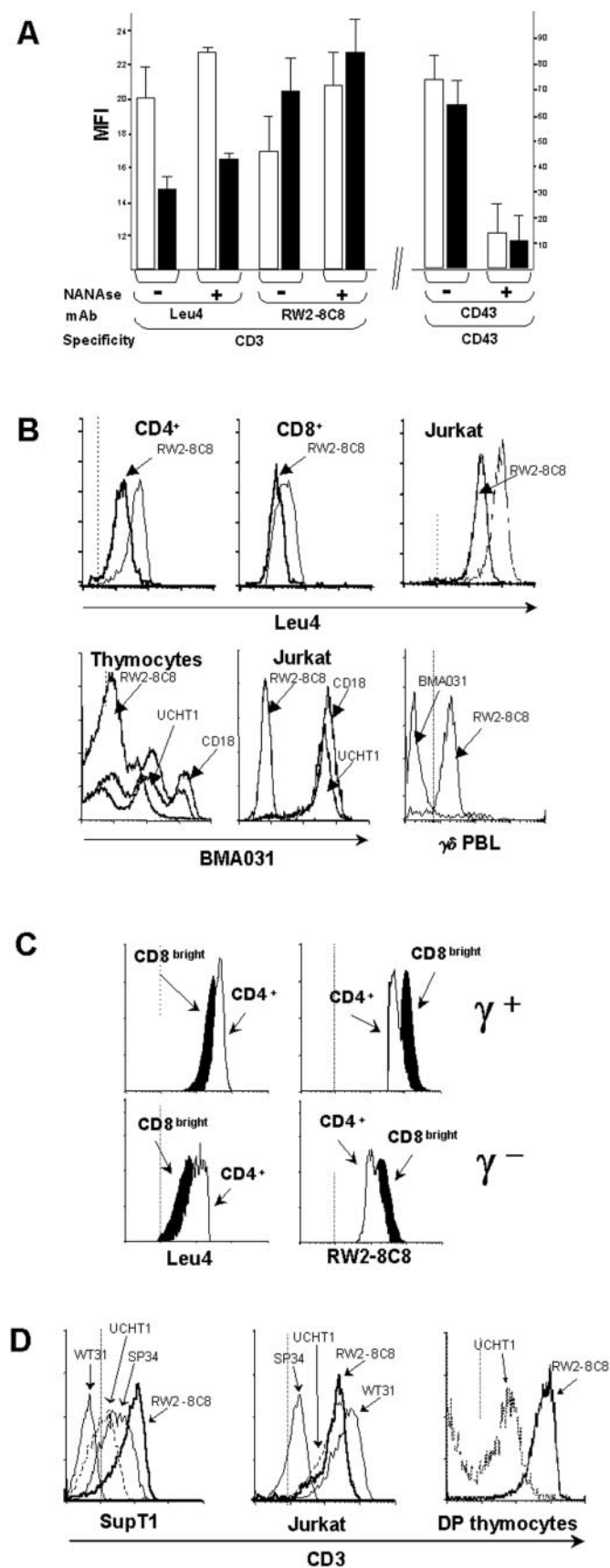


FIG. 6. Characterization of the RW2-8C8 antibody. **A**, purified PBLs from normal donors were NANase-treated (+) to remove sialic acid residues or left untreated (–) and analyzed for surface binding of RW2-8C8, Leu4, and CD43 (positive control) within CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. **B**, mature or immature T cells were stained with Leu4-phycoerythrin (or UCHT1, not shown) or BMA031-phycoerythrin

(Fig. 6B) showed that preincubation with unlabeled RW2-8C8 blocked BMA031 but not Leu4 (or UCHT1, not shown) binding. In contrast, another CD3-specific mAb (UCHT1) or an irrelevant mAb (CD18) did not preclude BMA031 binding. However, RW2-8C8 is CD3- rather than TCR $\alpha\beta$ -specific, as it was shown to bind TCR $\gamma\delta$ ⁺ BMA031[–] PBLs (Fig. 6B, bottom right). Therefore, RW2-8C8 binds to a CD3 determinant that is closer to (or more influenced by mAb binding to) the BMA031 epitope than to the Leu4 or UCHT1 epitopes. Alternatively, these results are consistent with the existence of two isoforms of surface TCR-CD3 complexes, one that cannot be engaged by Leu4 or BMA031 if RW2-8C8 is present and another in which RW2-8C8 binding blocks BMA031 but not Leu4 or UCHT1 binding. Primary CD4⁺ and CD8⁺ γ [–] T lymphocytes were also analyzed for the expression of the epitope recognized by RW2-8C8. The results (Fig. 6C) indicated that RW2-8C8 but not Leu4 again stained CD8⁺ T cells better than it stained CD4⁺ T cells even when CD3 γ is absent. These results demonstrated that RW2-8C8 binds to a CD3 determinant that is more strongly expressed by CD8⁺ than by CD4⁺ T cells even in the absence of CD3 γ . The notion that RW2-8C8 may be detecting a distinct CD3 conformational epitope was explored in several T-lineage cell types as follows: 1) a cell line expressing the pre-TCR-CD3, an immature BMA031[–] TCR-CD3 complex in which the variable TCR α chain is replaced by the invariant pT α component (SupT1; Ref. 23); 2) Jurkat cells bearing the mature BMA031⁺ TCR $\alpha\beta$; and 3) CD4⁺CD8⁺ (double positive) thymocytes bearing an immature BMA031⁺ TCR $\alpha\beta$ (24). The results (Fig. 6D) showed that RW2-8C8 was the best CD3 antibody in terms of SupT1 or double positive thymocyte binding, but not for the conventional TCR-CD3 expressed by control Jurkat T cells. Taken together, these results indicated that RW2-8C8 binds to a peculiar CD3 determinant that is close to the TCR heterodimer, more prominent than those recognized by other CD3-specific mAb in immature TCR β -containing ensembles, and more strongly expressed by CD8⁺ than by CD4⁺ T cells even when CD3 γ is absent.

Finally, surface radioiodination and immunoprecipitation studies using both CD3- and TCR-specific mAbs were performed to compare the TCR-CD3 expressed by purified primary CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The results (Fig. 7) again revealed the existence of consistent differences in TCR (but not CD3) components between CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The densitometry ratio of high to low molecular weight forms of $\alpha\beta$ TCR (*TCRtg* (tg, totally glycosylated) in Fig. 7) was higher in CD4⁺ T cells than in CD8⁺ T cells (1.8 versus 1.4, 2.5 versus 1.6, and 1.7 versus 1.4 using CD3-, TCR β -, or TCR α +TCR β -specific mAbs, respectively). These differences are probably due to *N*-linked glycosylation trimming, because they disappeared after canase treatment.

DISCUSSION

Lineage-associated $\alpha\beta$ TCR-CD3 Variation—In the present report, we showed by several experimental approaches that CD4⁺ and CD8⁺ mature T lymphocytes do not express identical surface $\alpha\beta$ TCR-CD3 complexes. First, CD3 γ -deficient CD4⁺ and CD8⁺ T cells were shown to differ by the following three criteria: 1) CD3 δ chain glycosylation (Fig. 1 and Ref. 6);

before (thin histograms) or after (thick histograms) preincubation with unlabeled RW2-8C8, CD18, or UCHT1. Gated TCR $\gamma\delta$ ⁺ PBL reactivity patterns with BMA031 and RW2-8C8 are shown to illustrate that only the latter is CD3-specific (bottom right). **C**, representative reactivity patterns of RW2-8C8 (right) and Leu4 (left) in γ [–] CD4⁺ (open histograms) and CD8^{bright} (filled histograms) peripheral blood lymphocytes. **D**, comparative reactivity patterns of several mAbs with SupT1 (pT α TCR⁺), Jurkat ($\alpha\beta$ TCR⁺), and CD4⁺CD8⁺ (DP) thymocytes (immature $\alpha\beta$ TCR⁺).

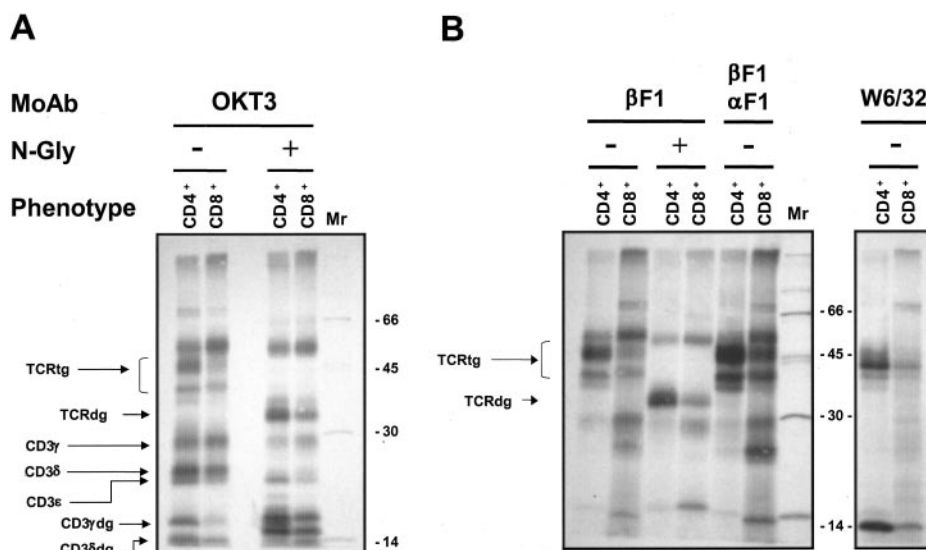


FIG. 7. Immunoprecipitation of surface-iodinated TCR-CD3 complexes from isolated $CD4^+$ and $CD8^+$ fresh peripheral blood lymphocytes. $CD4^+$ (15×10^6 cells) and $CD8^+$ (5×10^6 cells) PBLs from a normal donor were immunomagnetically isolated, surface-labeled with ^{125}I , lysed in 1% digitonin-containing buffer, precipitated with the indicated CD3-, TCR-, or HLA-specific mAb, and digested, where indicated (+), with N-glycosidase F (N-Gly) before electrophoresis under reducing conditions in 10% polyacrylamide gels. The positions of the expected TCR and CD3 proteins are indicated (dg, deglycosylated; tg, totally glycosylated).

2) $TCR\alpha$ and $TCR\beta$ chain content (Fig. 2 and 3; and 3) native $\alpha\beta$ TCR-CD3 migration (Fig. 4). Second, primary normal $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were shown to express conformationally and biochemically different surface $\alpha\beta$ TCR-CD3 complexes (Figs. 5 and 7, respectively), which were regulated by activation and differentiation for certain epitopes, likely due to lipid raft-dependent arrangements or glycosylation. These results confirm our previous biosynthetic and phenotypic studies in $CD3\gamma$ -deficient T cells (6) and extend the observations to primary T lymphocytes from normal individuals. Biosynthetic studies showed that $CD8^+$ but not $CD4^+$ $CD3\gamma$ -deficient T cells contained a small $\alpha\beta$ heterodimer composed of abnormally glycosylated $TCR\beta$ and an abnormally small CD3-associated chain that was not recognized by $TCR\alpha$ -specific antibodies. However, the $TCR\alpha$ gene was normal, and the atypical 32-kDa $TCR\alpha$ observed intracellularly was indeed shown to be $TCR\alpha$ by protein sequencing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (data not shown).

The TCR-CD3 complex is a very flexible structure. For instance, the $\gamma\delta$ TCR (and $\gamma\delta$ T cell development) can be quite $CD3\delta$ -independent in mice (5, 25). There are descriptions of $CD3$ -specific mAb that do not bind the $\gamma\delta$ TCR-CD3 complex unless it was deglycosylated previously (WT31, 12), and even T cell activation can modify $CD3\gamma$ glycosylation (18) with clear biochemical consequences. Similarly, $\alpha\beta$ TCR-CD3 expression is possible without $CD3\gamma$ (4, 8) or δ (5), but not without both (26). Therefore, it is not surprising that further flexibility is present in $CD4^+$ versus $CD8^+$ T cells, particularly when $CD3\gamma$ is absent, but also in normal donors. The mAbs used for surface TCR-CD3 detection were obtained using different antigens (bulk PBL or thymocytes, purified primary T cells or T cell lines, solubilized cell membranes, purified TCR-CD3 proteins, etc.) and different screening criteria (fresh, fixed, or tumor T cell binding, cytolysis blocking, PBL stimulation, etc.) (27). Therefore, a possible explanation for the observed lineage-specific binding differences could stem from the immunization or screening criteria used in each case, a situation that would favor naïve $CD4^+$ and lipid raft-dependent over naïve $CD8^+$ and lipid raft-independent TCR-CD3 binding with certain mAbs. These differences could be exploited for therapeutic purposes, such as lineage-specific immunosuppression during graft rejection.

What could be the mechanism responsible for the observed lineage-dependent biochemical TCR-CD3 differences? Because all of the subunits are present in both cases (even with the same stoichiometry, if isolated with digitonin), we believe that there must be biochemical differences in the way the complex is assembled, glycosylated, trimmed, or topologically arranged in the cell surface in each T cell subset after the lineage decision is reached and apparently also upon antigen recognition (28). The reported physical association of $CD3\delta$ with the raft-resident coreceptor molecules $CD4$ and $CD8$ on resting T lymphocytes could contribute to the observed differences (21, 29). In addition, the individual TCR-CD3 subunits could possess slightly distinct structures. These differences could be caused by developmentally acquired fundamental changes that distinguish the two cell types, including the glycosylation machinery (30, 31) or chaperones. For instance, the inactivation of a sialyl-transferase (ST3Gal-I) strongly reduced peripheral $CD8^+$ but not $CD4^+$ cell numbers (32). Further work is required to address this issue, perhaps through a comparative genomic approach that includes the chaperones and enzymes involved in glycosylation pathways. Interestingly, TCR-CD3 signaling capacity and dynamics are not affected by the observed biochemical differences, either with or without $CD3\gamma$ (6–8), further suggesting that the changes are required for optimal receptor-coreceptor *cis* interactions during antigen recognition and signal transduction in each cell type (33). An alternative interpretation is that two different TCR populations exist on the cell membrane and that their relative proportions change in different T cell subsets. Antibodies such as RW2-8C8 may detect those changes.

$\alpha\beta$ TCR-CD3 Structure and Function—The results are consistent with a recent report on the structure and stoichiometry of the TCR-CD3 complex *in vitro* (34). The authors demonstrated that $CD3\gamma$ is important for incorporation of ζ but not ϵ to the complex, as shown in Fig. 1A ($CD3$ -associated ζ is very scarce in γ^- cells) and in Ref. 6. They also proved that, whereas $TCR\alpha$ is strictly associated to $\delta\epsilon$ dimers, $TCR\beta$ can interact with $\gamma\epsilon$ as well as with $\delta\epsilon$ dimers. This apparent biochemical promiscuity may explain why surface TCR-CD3 adopts a $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2\zeta_2$ stoichiometry (Fig. 4) and why its expression is so notable despite the lack of $CD3\gamma$ (7). Although the

same authors showed that isolated $\alpha\beta$ and $\delta\epsilon$ dimers do not normally assemble into $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2$ complexes *in vitro*, intrathymic selection mechanisms may expand, *in vivo*, the otherwise rare T cell precursors that manage to assemble a viable surface TCR-CD3 complex with such stoichiometry. *In vivo* observations further support this contention, because human CD3 γ -deficient individuals showed significant T cell development with only mild lymphopenia and immunodeficiency, whereas CD3 δ -deficient patients had no T cells and very severe clinical abnormalities (35).

Acknowledgments—We greatly appreciate the generous supply of rIL2 from Dr. Craig W. Reynolds (Frederick Cancer Research and Development Center, NCI, National Institutes of Health, Frederick, MD) and the technical help provided at our university by Dr. A. Alvarez-Barrientos of the Central Cytometry Facility (confocal studies), Dr. A. Varas of the Department of Cell Biology (cytospins), and B. Fernández of the Department of Immunology (cell cultures). We also thank the Pediatric Cardiosurgery Units from Centro Especial Ramón y Cajal and Ciudad Sanitaria La Paz (Madrid) for the thymus samples and the mAb donors cited under “Experimental Procedures.”

REFERENCES

- Alarcon, B., Gil, D., Delgado, P., and Schamel, W. W. (2003) *Immunol. Rev.* **191**, 38–46
- Thibault, G., and Bardos, P. (1995) *J. Immunol.* **154**, 3814–3820
- Timón, M., Arnaiz-Villena, A., Rodríguez-Gallego, C., Pérez-Aciego, P., Pacheco, A., and Regueiro J. R. (1993) *Eur. J. Immunol.* **23**, 1440–1444
- Haks, M. C., Krimpenfort, P., Borst, J., and Kruisbeek, A. M. (1998) *EMBO J.* **17**, 1871–1882
- Dave, V. P., Cao, Z., Browne, C., Alarcón, B., Fernández-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S., and Kappes D. J. (1997) *EMBO J.* **16**, 1360–1370
- Zapata, D. A., Pacheco-Castro, A., Torres, P. S., Ramiro, A. R., San José, E., Alarcón, B., Alibaud, L., Rubin, B., Toribio, M. L., and Regueiro, J. R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 35119–35128
- Torres, P. S., Alcover, A., Zapata, D. A., Arnaud, J., Pacheco, A., Martín-Fernández, J. M., Villasevil, E. M., Sanal, O., and Regueiro J. R. (2003) *J. Immunol.* **170**, 5947–5955
- Pacheco-Castro, A., Alvarez-Zapata, D., Serrano-Torres, P., and Regueiro J. R. (1998) *J. Immunol.* **161**, 3152–3160
- Lim, L. C., Fiordalisi, M. N., Mantell, J. L., Schmitz, J. L., and Folds, J. D. (1998) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**, 392–398
- Drake, D., III, and Braciale T. (2001) *J. Immunol.* **166**, 7009–7013
- Uhlén, M., Masucci, M., and Levitsky V. (2003) *Scand. J. Immunol.* **57**, 99–106
- van de Griend, R. J., Borst, J., Tax, W. J., and Bolhuis, R. L. (1988) *J. Immunol.* **140**, 1107–1110
- Borche, L., Lozano, F., Vilella, V., and Vives, J. (1987) *Eur. J. Immunol.* **17**, 1523–1526
- Schamel, W. W. A., and Reth M. (2000) *Immunity* **13**, 5–14
- Schägger, H., and Jagow, G. (1991) *Anal. Biochem.* **199**, 223–231
- Spits, H., Borst, J., Tax, W., Capel, P. J., Terhorst, C., and de Vries J. E. (1985) *J. Immunol.* **135**, 1992–1998
- Meuer, S. C., Hodgdon, J. C., Hussey, R. E., Protentis, J. P., Schlossman, S. F., and Reinherz E. L. (1983) *J. Exp. Med.* **158**, 988–993
- Hayes, S. M., Laky, K., El Khoury, D., Kappes, D. J., Fowlkes, B. J., and Love P. E. (2002) *J. Exp. Med.* **196**, 1355–1361
- Mackall, C. L., Granger, L., Sheard, M. A., Cepeda R., and Gress R. E. (1993) *Blood* **82**, 2585–2594
- Meinl E., Hohlfield, R., Wekerle, H., and Fleckenstein B. (1995) *Immunol. Today* **16**, 55–58
- Doucey, M. A., Goffin, L., Naeher, D., Michielin, O., Baumgartner, P., Guillaume, P., Palmer, E., and Luescher, I. F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3257–3264
- Hartel, S., Diehl, H., and Flavo O. (1998) *Anal. Biochem.* **258**, 277
- Carrasco, Y. R., Ramiro, A. R., Trigueros, C., de Yebenes, V. G., García-Peydro, M., and Toribio, M. L. (2001) *J. Exp. Med.* **193**, 45–58
- Finkel, T. H., McDuffie, M., Kappler, J. W., Marrack, P., and Cambier, J. C. (1987) *Nature* **330**, 179–181
- Hayes, S. M., and Love, P. E. (2002) *Immunity* **16**, 827–838
- Malissen, B., Ardouin, L., Lin, S. Y., and Malissen, M. (1999) *Adv. Immunol.* **72**, 103–148
- Yokoyama W. M. (1991) in *Current Protocols in Immunology* (Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Trober, W.) pp. 2.5.1–2.5.17, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York
- Daniels, M. A., Hogquist, K. A., and Jameson, S. C. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 903–910
- Suzuki, S., Kupsch, J., Eichmann, K., and Saizawa, M. K. (1992) *Eur. J. Immunol.* **22**, 2475–2479
- Daniels, M. A., Devine, L., Miller, J. D., Moser, J. M., Lukacher, A. E., Altman, J. D., Kavathas, P., Hogquist, K. A., and Jameson S. C. (2001) *Immunity* **15**, 1051–1061
- Moody, A. M., Chui, D., Reche, P. A., Priatel, J. J., Marth, J. D., and Reinherz, E. L. (2001) *Cell* **107**, 501–512
- Priatel, J. J., Chui, D., Hiraoka, N., Simmons, C. J. T., Richardson, K. B., Page, D. M., Fukuda, M., Varki, N. M., and Marth, J. M. (2000) *Immunity* **12**, 273–283
- Garcia, K. C., Scott, C. A., Brunmark, A., Carbone, F. R., Peterson, P. A., Wilson, I. A., and Teyton, L. (1996) *Nature* **384**, 577–581
- Call, M. E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., and Wucherpfennig, K. W. (2002) *Cell* **111**, 967–979
- Dadi, H. K., Simon, A. J., and Roifman, C. M. (2003) *New Eng. J. Med.* **349**, 1821–1828

**IDENTIFICATION OF A FUNCTIONAL BINDING SITE FOR CIN85/CMS
ADAPTORS IN THE HUMAN PRE-TCR α CYTOPLASMIC TAIL
Gretel Nusspaumer*^{\$&}, María N. Navarro*^{\$}, Patricia Fuentes*, and María L.
Toribio***

^{\$}Contributed equally to this work

*Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

[&]Present address: Department of Research, Center for Biomedicine, University of Basel, Mattenstrasse 28, CH-4058 Basel, Switzerland.

Running Title: CIN85/CMS as functional adaptors of pT α

Address correspondence to: María L. Toribio, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain, Phone: 34 91 497 8076; Fax: 34 91 497 8087;
Email: mtoribio@cbm.uam.es

Summary

The TCR β -pre-TCR α (pT α) pre-T cell receptor (pre-TCR) signals the expansion and differentiation of developing thymocytes. Pre-TCR signalling is critically dependent on an intact pT α cytoplasmic domain, but the molecular mechanisms involved remain unknown. Here, we identified a polyproline-arginine sequence in the human pT α cytoplasmic tail which fits the reported recognition consensus for SH3 domains of the CIN85/CMS family of adaptors. This pT α motif was indeed shown to interact with CIN85/CMS SH3 domains and to mediate the recruitment of multiadaptor complexes containing all family members (CMS, CIN85 and CD2BP3). We also show that CMS transcription was selectively upregulated during thymopoiesis in pre-T cells undergoing pre-TCR-mediated signalling. Activation through the pre-TCR induced pre-TCR clustering, and early recruitment of CMS and polymerized actin that localized to endosomal vesicles at the site of pre-TCR activation. Internalized pT α was shown to colocalize with CMS and polymerized actin in the endocytic pathway, before sorting to lysosomal degradation. Lastly, we found that the deletion of the CIN85/CMS-binding motif impaired pre-TCR signalling, as measured by Ca²⁺ mobilization or NFAT activation. These results identify CIN85/CMS proteins as the first known intracellular adaptors of pT α involved in pre-TCR function.

Introduction

Intrathymic differentiation of $\alpha\beta$ T lymphocytes is a highly regulated process that is controlled at two consecutive checkpoints through distinct surface receptors, namely the pre-TCR and the $\alpha\beta$ TCR, which are sequentially expressed on developing thymocytes (1,2). Upon successful rearrangement at the TCR β locus, a TCR β chain pairs covalently with the invariant pre-TCR α (pT α) chain and non-covalently with CD3 subunits (ϵ , δ , γ , and ζ) to form the pre-TCR complex (1-3). Surface expression of the pre-TCR (4) signals the selection, expansion, and further differentiation of developing pre-T cells, a process termed β -selection (1,2,5,6). Thereafter, pT α expression is shut down, TCR α gene rearrangements are induced, and the TCR β chain pairs with TCR α and associates with CD3 to form the mature $\alpha\beta$ TCR, which allows developing thymocytes to undergo a second step of selection upon binding to self-peptide-MHC complexes (1,2).

The similar biochemical composition of the pre-TCR and the $\alpha\beta$ TCR, which only differ in the presence of the invariant pT α chain instead of the rearranged TCR α chain, has supported the view that pT α is simply a “surrogate” TCR α chain (7). However, pT α and TCR α are not interchangeable partners of TCR β during T cell development (8), indicating that the pT α molecule endows the pre-TCR with unique functional properties that are not shared by the TCR α chain. Particularly, signalling through the pre-TCR, in contrast to TCR signalling, occurs apparently in a ligand-independent manner (9), simply as a result of expression of the pre-TCR at the cell surface (4), indicating that pre-TCR complexes are constitutively activated (10). This feature was initially associated with the capacity of the pre-TCR to spontaneously cluster and localize to membrane lipid rafts in a way similar to that of ligand-activated $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ TCRs (10-12). Recently, it has been shown that the pre-TCR complex can deliver its signal autonomously through oligomerization of the pT α chain mediated by charged residues in its extracellular domain (13), a finding that challenges the initial view that the extracellular pT α domain is dispensable for pre-TCR signalling (9). Besides the conserved charged amino acid residues in the pT α extracellular domain, specific structural features of the pT α chain that might account for unique properties of the pre-TCR include the presence of a long pT α cytoplasmic tail (30 and 114 amino acids in mouse and man, respectively) as compared to TCR α (3 amino acids). However, murine and human pT α molecules, although highly homologous at the extracellular and transmembrane domains, differ significantly in their cytoplasmic domains, a finding that has been used as an argument to preclude an important functional role of this pT α region in pre-TCR signalling. Consistent with this view, initial studies in mice showed that a transgenic tail-less form of pT α could substitute for the wild type molecule during thymocyte development (14,15). In contrast, other studies supported the biological significance of the cytoplasmic domain

of the human pT α molecule. In particular, the human pT α cytoplasmic tail was shown to serve an endoplasmic reticulum (ER) retention function that could partly contribute to the regulation of pre-TCR assembly and expression (16). More importantly, constitutive internalization and degradation of the pre-TCR (17,18), a feature that might contribute significantly to the limited cell-surface expression of the receptor (6,8,19), was proved dependent on the pT α cytoplasmic tail in human pre-T cells (17). While species-specific structural differences of the pT α cytoplasmic domain have been suggested to account for distinct functional outcomes in mouse and man, novel data have recently pointed to an essential and previously unappreciated role played by the pT α cytoplasmic tail during thymocyte development in mice. Specifically, the murine C-terminal cytoplasmic pT α portion was shown crucial for pre-TCR signalling and $\alpha\beta$ T cell production (20). What exactly the pT α cytoplasmic domain does to promote signalling by the pre-TCR remains an open question, but proper pre-TCR function was proposed to require the contribution of two proline-rich sequences present in the C-terminal cytoplasmic portion of murine pT α (20). It is thus possible that polyproline sequences in the pT α cytoplasmic domain directly interact with molecules that propagate signals emanating from the pre-TCR. However, so far, there has been no success in identifying proteins that associate with the pT α cytoplasmic tail.

The proline-rich sequence that is reiterated in the murine pT α cytoplasmic domain (PPTHR and PPSRK) and its human homolog (PPGRK) are different from the consensus PXXP or PPLP SH3-binding motifs (21), but display some homology to the PPGHR sequence of the cytoplasmic tail of CD2 (6,20). We show in this study that, besides this conserved CD2-like proline-rich sequence, the human pT α cytoplasmic tail carries a C-terminal non-canonical proline-rich sequence, and a polyproline-arginine sequence, which features the atypical recognition consensus recently identified for SH3 domains of the CIN85/CMS family of multidomain adaptor proteins (22,23). Biochemical studies shown here allowed us to identify CIN85 and CMS as the first known intracellular adaptors of human pT α and to provide evidence that the polyproline-arginine motif identified in the human pT α cytoplasmic domain is an indispensable binding site for the SH3 domains of CIN85/CMS adaptor molecules. Moreover, CMS is shown to follow the pT α endocytic pathway and to be involved in pre-TCR signalling. Therefore, our data suggest that the polyproline-arginine motif endows the human pT α cytoplasmic domain with an atypical SH3-binding site critical for interaction with intracellular adaptors required for pre-TCR function.

Results

CIN85 and CMS interact with the cytoplasmic domain of human pT α through different SH3 domains

It has previously been shown that the human pT α cytoplasmic domain carries a CD2-like proline-rich sequence (Pro2 in Fig. 1A) that is reiterated within the murine pT α gene (6,20). While searching for putative interacting partners of pT α that could be involved in pre-TCR signalling, we found that the cytoplasmic tail of the human pT α molecule carries two additional proline-based sequences. In particular, we identified a non-canonical polyproline sequence (LPPPL) (Pro3) downstream of Pro2, and also a polyproline-arginine sequence (SPRPQPR) (Pro1) placed directly upstream of Pro2 (Fig. 1A). The Pro1 sequence was found to feature the PX(P/A)XXR or PXXXPR motif recently characterized as a recognition consensus of CIN85/CMS SH3 domains present in multiple signalling molecules (22,23), including the CD2 receptor in T cells (24). These data prompted us to investigate whether members of the CIN85/CMS family of adaptor proteins could interact with the pT α cytoplasmic tail as well.

As shown schematically in Fig. 1B, CIN85/CMS adaptor proteins share a similar structure, with three SH3 domains in the amino end, a central proline-rich region and a C-terminal coiled-coil domain (25). The CIN85/CMS family also includes a CIN85 isoform, known as CD2BP3, which lacks the first SH3 domain due to alternative splicing (25,26). To investigate whether members of the CIN85/CMS family of adaptors physically interact with the human pT α chain, pull-down assays were performed using a Glutathione S-transferase (GST)-pT α fusion protein containing the human pT α cytoplasmic domain. Total cell lysates from COS7 cells transiently expressing full-length Flag-tagged CIN85, CMS or CD2BP3 proteins were precipitated with either GST-pT α or GST, as a control. As shown in Fig. 1C, immunoblotting of bound proteins with an anti-Flag monoclonal antibody (mAb) revealed that both CIN85 and CMS molecules specifically associate with the cytoplasmic tail of human pT α . However, interaction of CD2BP3 was hardly detected (see below, and Fig. 5). To analyze whether CMS and CIN85 bind to the pT α cytoplasmic domain also *in vivo*, immunoprecipitation assays were performed using the human pre-T cell line SupT1, which naturally expresses the pre-TCR complex at surface levels equivalent to those found on primary thymocytes (16). Total cell lysates of SupT1 cells either transfected with an empty vector or with CMS-Flag were incubated with a polyclonal antibody against the human pT α tail (16) and coimmunoprecipitated molecules were detected by immunoblotting with anti-Flag. As shown in Figure 1D, CMS was coimmunoprecipitated with pT α from non-stimulated SupT1 cells at low mounts, as expected from the low pre-TCR surface levels expressed by SupT1. Stimulation of SupT1 cells with an anti-CD3 ϵ mAb resulted in similar CMS-pT α coimmunoprecipitation levels (data not shown). In contrast, equivalent experiments

failed to reveal a CIN85-pT α association *in vivo*, even under activating conditions (data not shown), suggesting that CIN85 had a weaker affinity for pT α than CMS in SupT1 pre-T cells. Therefore, CMS specifically associates both *in vitro* and *in vivo* with the cytoplasmic tail of human pT α .

To identify the specific CIN85/CMS domains involved in pT α chain interactions, GST-pT α pull-down experiments were performed using Flag-tagged truncated proteins containing distinct combinations of the SH3 domains and/or the proline-rich and coiled-coil domains of either CIN85 or CMS (Fig. 2A and 2B, respectively). Constructs encoding full-length CIN85 or CMS proteins were used as controls. As shown in Fig. 2C, the CIN85 truncated forms SH3ABC and SH3AB were precipitated at higher amounts than full-length CIN85 (lanes 1, 2, 3), while association of the CIN85-SH3BC form was not detectable. Neither did we find binding to pT α of CIN85 forms lacking the SH3AB domains (Fig. 2C, lanes 4, 5, 6). These data indicate that the SH3A domain of CIN85 is indispensable for specific interaction with the pT α cytoplasmic tail. Accordingly, CD2BP3, the splicing variant of CIN85 that lacks the SH3A domain, showed a very inefficient binding to pT α (see below and Fig. 5). In contrast to CIN85, high amounts of the entire CMS protein were coprecipitated with pT α , further supporting that CMS interacts with pT α more efficiently than CIN85 (compare Fig. 2D, lane 1 with Fig. 2C, lane 1), and it also bound to pT α more efficiently than the CMS-SH3ABC truncated form (Fig. 2D, lanes 1 and 2). Notably, deletion of the SH3C or SH3A domains of CMS abolished the interaction of the remaining SH3 domains to pT α (Fig. 2D, lanes 3 and 4), indicating that either the three CMS SH3 domains or at least both SH3A and SH3C are simultaneously required for interaction of CMS with the cytoplasmic tail of human pT α . No association to pT α of the C-terminal CMS fragment lacking the SH3 domains was observed (Fig. 2D, lane 5). As a whole, these data reveal that CIN85 and CMS can bind through different SH3 domains to the human pT α cytoplasmic tail.

Identification of the specific CIN85/CMS SH3 binding motif in the human pT α cytoplasmic tail

To assess the identity of the polyproline sequence/s in the human pT α tail responsible for the interaction with CIN85/CMS SH3 domains, pull-down experiments were next performed using GST-fused pT α tail mutant forms (pT α Δ Pro1-3) that lacked each of the three polyproline sequences shown in Figure 2E. We found that GST-pT α Δ Pro2 and GST-pT α Δ Pro3 fusion mutants and the wild-type GST-pT α form precipitated similar amounts of full-length CIN85 or CMS, and no differences in their interaction patterns with the SH3ABC, SH3AB and SH3BC CMS and CIN85 truncated forms was observed. (Fig. 2C, D). These data suggest that neither the distal C-terminal (Pro3) nor the CD2-like (Pro2) proline-rich motifs of the human pT α tail are involved in binding of CIN85/CMS adaptor molecules. In contrast, deletion of the polyproline-arginine (Pro1) motif completely impaired the ability of pT α to associate with

CIN85 and CMS SH3 domains (Fig.2 B, C), indicating that Pro1 is a *bona fide* motif for CIN85 and CMS SH3 binding to human pTα. As a whole, these data provide evidence that interaction of CIN85/CMS SH3 domains with the human pTα cytoplasmic tail specifically involves the Pro1 polyproline-arginine motif, and identify the human pTα molecule as a novel CIN85/CMS interacting partner.

CD2BP3 is recruited to pTα through its association with CMS and CIN85

The observation that the SH3A domain of CIN85 is required for binding to the pTα Pro1 motif suggested that CD2BP3, the splicing variant of CIN85 that lacks SH3A, would display a very inefficient, if any, pTα binding capability. In fact, when Flag-tagged CD2BP3 constructs were checked in pull-down assays, CD2BP3 was hardly precipitated with GST-pTα even under overexpression conditions (Fig. 3A). Because CMS and CD2BP3 can heterodimerize through interactions mediated by their coiled-coil domains (25,27), we sought to determine whether CMS-CD2BP3 heterodimers could be recruited to the pTα chain. To this end, binding of CMS to pTα was analyzed by pull-down in the absence or presence of increasing amounts of CD2BP3. Results in Fig. 3B show that equivalent amounts of CMS were precipitated associated with pTα regardless of the presence of CD2BP3 in the assay, indicating that CD2BP3 is unable of competing the interaction of CMS to pTα. Rather, CD2BP3 was coprecipitated with CMS in a dose-dependent manner in GST-pTα pull-downs (Fig. 3B), indicating that CD2BP3 is recruited to pTα through CMS. Similar experiments were then performed to investigate whether also CIN85 could recruit CD2BP3 to the pTα tail. Because CIN85 and CD2BP3 have a similar size, HA-tagged CIN85 and Flag-tagged CD2BP3 constructs were used to better distinguish between the two proteins. We found that the amount of CD2BP3 bound to pTα increased in the presence of CIN85 in a dose-dependent manner (Fig. 3C), confirming that CIN85 can interact with CD2BP3 and is able to recruit it to the pTα cytoplasmic domain. Therefore, both CIN85 and CMS can mediate the recruitment of CD2BP3 to the pTα molecule.

Next, experiments were performed to assess whether CIN85 and CMS could compete with each other for pTα binding and/or for recruitment of CD2BP3. GST-pTα pull-down assays of COS7 cells transfected with CMS, CD2BP3, and increasing amounts of CIN85 constructs revealed that CIN85 did not impair binding of CMS to pTα, nor CD2BP3 recruitment. In contrast, the amounts of both CMS and CD2BP3 coprecipitated with pTα increased in the presence of CIN85 in a dose-dependent manner (Fig. 3D). As a whole, we can conclude that multiprotein complexes involving CMS, CIN85 and CD2BP3 molecular adaptors can be recruited to the cytoplasmic domain of the human pTα chain, likely owing to hetero-oligomerization mediated by their coiled-coil domains.

Differential regulation of CIN85/CMS gene expression during human thymic development

CIN85/CMS adaptors are ubiquitously expressed. However, some members of the family are transcriptionally regulated during the development of particular tissues and organs in which they are functionally involved, as has been shown for CD2AP/CMS during kidney development (28). Thus, to approach the relevance of CIN85/CMS in pre-TCR function, gene expression analysis of CIN85/CMS members was performed in human primary pre-T cells undergoing intrathymic development. Since pre-TCR expression during thymopoiesis is stage-specific and depends on the transcriptional regulation of pT α (1,29), developmental gene expression of CIN85/CMS was analyzed in concert with pT α expression. To this end, Northern blot hybridization was performed of RNA samples obtained from sorted human thymocyte subsets placed at discrete intrathymic stages surrounding pre-TCR expression and β -selection (Fig. 4A). The pre-T cell line SupT1 was included in the study as a pre-TCR-positive control. As shown previously (12), pT α transcription was maximal in pre-T cells placed upstream of the β -selection check-point (pre- β), decreased in downstream pre-TCR-expressing pre-T cells (pre-TCR⁺) and became minimal in β -selected thymocytes with downregulated pre-TCR surface expression (post- β), and was essentially undetectable in later DP and SP thymocytes expressing the $\alpha\beta$ TCR (Fig. 4B). Simultaneous hybridization with CMS and CIN85 probes was next performed to assess expression of both CMS (4.6-Kb) and CIN85 (3.4-Kb) mRNAs in the thymocyte subsets analyzed for pT α transcription. The CIN85 probe also identified an additional 2.7-Kb transcript corresponding to the CD2BP3 splicing variant of CIN85. Representative results in Fig. 4B revealed that transcription of the three CIN85/CMS members is differentially regulated during human intrathymic development. Measurements of relative mRNA amounts normalized to β -actin transcripts (Fig. 4C) indicated that expression of both CD2BP3 and CIN85 splicing isoforms remained essentially constant throughout development. In contrast, CMS transcription was upregulated in pre-TCR⁺ thymocytes, increased up to 3.5-fold in post- β -selected pre-T cells, but decreased thereafter in DP thymocytes expressing the mature $\alpha\beta$ TCR, and returned to basal levels at the SP stage (Fig. 4C). Accordingly, relatively high levels of CMS transcription were detected in SupT1 pre-T cells. These results indicate that CMS transcription is specifically upregulated in pre-T cells undergoing pre-TCR-mediated signalling and β -selection, and support the possibility that CMS is involved in pre-TCR function.

CMS localizes to the endocytic pathway in human pre-T cells.

To get some insights into the functional role of CMS in human pre-T cells, our first goal was to assess its subcellular distribution. To this end, we performed confocal microscopy analysis in SupT1 pre-T cells that were transiently transfected with GFP-tagged CMS and stained with

antibodies specific for distinct intracellular compartments. As shown in Fig. 5, CMS was detected in the cellular periphery dispersed throughout the cytosol, but it was mostly confined to cytosolic vesicular structures that fully colocalized with polymerized actin, as revealed by labeling with phalloidin. Since CMS contains four actin-binding domains, the observed pattern suggests that CMS is linked to the actin cytoskeleton in pre-T cells. Accordingly, a diffuse GFP pattern was observed when a GFP-tagged mutant form of CMS comprising the SH3ABC domains was overexpressed in SupT1 cells. Immunocytochemical analyses performed to assess the identity of the CMS-actin-rich vesicles revealed that they partly colocalized with the marker of the early endosomal compartment EEA1 (Fig. 6), but essentially no colocalization with the lysosomal marker Lamp1 was found (Fig. 6). Partial colocalization with CD63, which marks late endosomal and lysosomal compartments was also observed (Fig. 6). These data suggest that CMS localizes to the endosomal compartment, but is excluded from the lysosomal compartment, in SupT1 pre-T cells.

Recruitment of CMS and actin cytoskeleton to the site of pre-TCR activation

CMS (CD2AP in mice) was originally described to interact with the CD2 protein in mature T cells and to participate in CD2 clustering and cytoskeletal reorganization following CD2 ligand attachment (24). We thus next determined whether CMS was involved in pre-TCR patterning during pre-T cell activation. To this end, we examined the localization of CMS in SupT1 cells transfected with CMS-GFP following anti-CD3 ϵ -induced pre-TCR activation. Pre-TCR staining using an anti-pT α mAb revealed that cellular stimulation resulted in redistribution and clustering of the pre-TCR on the cell surface. Notably, CMS-rich clusters appeared at the area of pre-TCR engagement colocalizing with the pre-TCR (Fig. 7A). Clustering of CMS and pre-TCR was also induced, although less efficiently, with a mAb against the pT α molecule (data not shown).

To confirm that CMS is recruited to the site of pre-TCR activation, we then monitored the fate of CMS over time in SupT1 cells fixed at various times after pre-TCR stimulation with anti-CD3 ϵ -coated magnetic beads. Recruitment of CMS-GFP to the zone of pre-TCR engagement was efficiently induced within the first 5 min of stimulation. Staining with phalloidin revealed the redistribution of polymerized actin to the same area and its colocalization with CMS (Fig. 7B). Notably, we found that CMS and actin fully colocalized in vesicular structures that accumulate at the zone of tight contact of the pre-T cell with the stimulatory bead. As shown above for unstimulated pre-T cells, some of the CMS-rich vesicles stained with the early endosomal marker EEA1 and with anti-CD63, but not with anti-Lamp1 (data not shown). Therefore, signalling through the pre-TCR induces pre-TCR clustering and recruitment of CMS and polymerized actin that colocalized in endosomal vesicles at the site of pre-TCR stimulation.

CMS follows the pre-TCR endocytic pathway

Previous studies have shown that the pre-TCR is constitutively internalized and sorted for lysosomal degradation in pre-T cells (28). Thus, we next asked whether CMS/actin-rich endocytic vesicles, present constitutively in unstimulated pre-T cells and accumulated at the pre-TCR clustering area upon pre-TCR engagement, do actually contain internalized pre-TCR proteins. To investigate this possibility, we monitored the fate of surface pre-TCR complexes over time in unstimulated CMS-GFP-expressing Sup-T1 cells fixed at various times after labeling with an anti-pT α mAb. Since this mAb was proved to preserve the turn-over of the pre-TCR, this assay allows to assess for the constitutive pre-TCR fate independently of exogenous activation. Confocal microscopy analyses showed that the pT α chain was efficiently internalized in unstimulated cells within the first 15 min following surface labeling. At this time, up to 50% of labeled pT α molecules localized to CMS-rich vesicles, but little colocalization with Lamp1-positive lysosomes was observed (Fig. 8). Over time (within 30 min), pT α colocalization with CMS-rich vesicles decreased, while increased proportions of pT α molecules localized to Lamp1+ vesicles, which did not colocalize with CMS (Fig. 8). These results indicate that CMS follows the pre-TCR endocytic pathway, but is excluded from the lysosomal compartment.

Binding of CMS to the proline-arginine motif in the human pT α cytoplasmic tail is involved in pre-TCR signalling

Previous results have demonstrated that pre-TCR signalling in mice promotes T-cell differentiation through Ca²⁺-dependent signals (30), and have proposed the requirement of an intact pT α tail in the process (20). Thus we next investigated the relevance of the proline-arginine CIN85/CMS binding motif identified in the human pT α tail in pre-TCR signalling. To this end, Ca²⁺ mobilization assays were performed after CD3 ϵ -crosslinking on the TCR α -deficient Jurkat mutant JR3.11 (16) transduced with a bicistronic retroviral vector encoding EGFP as reporter and Flag-tagged versions of either pT α WT or a pT α Δ Pro1 mutant lacking the polyproline-arginine motif. Immunoprecipitation assays using an anti-Flag mAb showed that sorted EGFP⁺ transduced cells expressed comparable levels of the wild type or mutant pre-TCR (Fig. 9A), and equivalent pre-TCR expression levels were observed at the cell surface as well (Fig. 9B). As previously shown in pre-T cells (12,30), CD3 ϵ -crosslinking induced a [Ca²⁺]_i rise in JR3.11 cells that expressed pT α WT, which consisted of an initial rapid rise followed by a slow decrease (Fig. 9C). However, Ca²⁺ mobilization was markedly defective in JR.311 cells bearing the mutant pT α Δ Pro1 chain, although the capability of these cells to release Ca²⁺ stores remained intact, as assessed by treatment with calcium Ionophore (Fig. 9C). These results suggested that the proline-arginine CIN85/CMS binding motif identified in the human pT α tail is required for appropriate pre-TCR signalling.

Intracellular Ca^{2+} rise is necessary for pre-TCR-induced activation of the NFAT transcription factor (30). Thus, as an additional approach to evaluate the contribution of the CIN85/CMS pT α binding motif to pre-TCR signalling, we next assessed the functionality of the NFAT transcriptional pathway in JR3.11 transduced cells. To this end, luciferase assays were performed in cells transfected with a reporter plasmid encoding the luciferase gene driven by a minimal promoter containing NFAT-response element. As shown in Fig. 9D, a marked increase in luciferase activity was induced by CD3 ϵ -crosslinking in JR3.11 cells expressing the pT α WT chain. However, activation of the NFAT-luciferase reporter gene was significantly less efficient in pT α Δ Pro1 mutants. More importantly, assays performed after specific pre-TCR crosslinking with an anti-pT α mAb (12) confirmed that activation of the NFAT transcriptional pathway was impaired in cells expressing a mutant pT α chain lacking the CIN85/CMS SH3-binding domain.

Discussion

Despite initial evidence that the function of the pre-TCR could be replaced by an early-expressed TCR $\alpha\beta$, it is now accepted that the exclusive capability of the pre-TCR in promoting T-cell development maps to the pT α cytoplasmic tail (7). Specifically, it was proposed that the two proline-rich sequences present in the C-terminal region of the murine pT α cytoplasmic tail are the critical pT α sequences involved in pre-TCR function (20). It is thus likely that the pT α cytoplasmic domain interacts with adaptor molecules that could propagate specific signals that emanate from the pre-TCR. In this study, we have approached the identification of such putative interacting partners in the human pT α chain, and provide biochemical evidence that the CIN85/CMS family of adaptors are cytosolic interactors of human pT α . However, CIN85/CMS binding to pT α does not involve the functional proline-rich sequence reported in mice and conserved in man. In contrast, we identify in human pT α a novel polyproline-arginine (SPRPQPR) sequence, absent in mice, as a *bona fide* binding site for CIN85/CMS SH3 domains, which features the PX(P/A)XXR or PXXXPR motif recently characterized as an atypical recognition consensus of multifunctional CIN85/CMS adaptors (22,23). Supporting the functional relevance of this interaction, we found that binding of CMS to human pT α is involved in pre-TCR signalling. Therefore, we conclude that the pT α polyproline-arginine domain endows the human pre-TCR with a specific SH3-binding site, independent of those conserved in mouse and those provided by CD3 components, critical for interaction with intracellular adaptors required for pre-TCR signalling.

By binding to numerous proteins, CIN85 and CMS assemble multimeric complexes and regulate cell-specific signals controlling neuronal cell apoptosis, receptor tyrosine-kinase signalling or T-cell activation (25). It is thus unlikely to be coincidental that the unique binding site of CIN85/CMS within the human pT α cytoplasmic tail is also conserved in the CD2

cytoplasmic domain of mouse and man (6), where it binds CMS/CD2AP (24,26), and enables CD2 receptor clustering and cytoskeletal polarization involved in immunological synapse formation and T-cell signalling (24,26,31). Besides CMS, both CIN85 and CD2BP3, the major splicing variant of CIN85 in human T cells, bind to the same CD2 cytoplasmic sequence but induce antagonistic functional activities, a finding that has been related with structural differences (24,26). Specifically, the SH3 domains of CIN85 and CD2BP3 bind to proline-rich sequences within CIN85/CD2BP3 themselves, while CMS lacks this self-regulated form of intramolecular interaction (23,26). This structural feature can explain our finding that CMS associates with pT α more efficiently than CIN85/CD2BP3 both *in vitro* and *in vivo*, and also concurs with the observation that full-size CIN85 interacts less efficiently with pT α than its truncated forms SH3ABC and SH3AB. As a whole, these structural differences argue that CIN85/CD2BP3 is regulated by intracellular biochemical processes differently than CMS. Thus, complex regulatory mechanisms may govern the overall balance of these proteins, particularly upon TCR-dependent activation of T cells (26). That CMS and CIN85/CD2BP3 all bind to the same pT α tail segment (although through distinct SH3 domains) suggest that similar regulatory mechanisms may operate in pre-T cells to favour CMS binding to pT α . In addition, our gene expression results suggest that transcriptional regulation events may also control competitive binding to pT α during T cell development and could contribute to guarantee a preferential association of CMS in pre-TCR⁺ cells. Although transcriptional regulation has not been previously described for CMS (32), it seems physiologically relevant for CIN85, since alternative splicing and different promoter usage at the CIN85 locus generate multiple mRNA messages with a cell-restricted pattern of expression (33)

Several signalling proteins shown previously to interact with the CIN85/CMS SH3 domains, such as the CD2 receptor, AIP1/Alix, SLP-65, Cbl/Cbl-b and SB-1, contain the proline-arginine motif identified here in human pT α (23). For some of these proteins, such as CD2 and Cbl, this interaction is activation-dependent (23-25,34). In contrast, we show that binding of CMS to pT α occurs *in vivo* in non-stimulated pre-T cells (this study) and is not improved after stimulation (not shown). These data suggest that the pT α chain displays an open conformation permissive for CMS binding, likely induced by constitutive activation of the pre-TCR (10,13). Besides interactions involving the SH3 domains, the proline-rich region of CIN85/CMS acts as an interaction module for additional SH3-containing proteins, such as focal adhesion protein p130^{Cas}, p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Grb2 or Src kinases involved in receptor tyrosine kinases (RTKs) signalling, and also for proteins such as endophilins, involved in cytoskeleton reorganization, vesicle formation, intracellular trafficking or endocytosis (25). In addition, the C-terminal coiled-coil domain is involved in homo- and heterodimerization with other members of the same family, which might add an additional level of complexity for formation of CIN85/CMS-associated protein networks involved in various intracellular signalling pathways (25). Accordingly, we found

that hetero-oligomers involving CMS and CIN85 can also be synergistically associated to pT α , while CD2BP3 is recruited to pT α through its association with CMS and CIN85. Although the physiological relevance of this finding needs to be validated *in vivo*, it is possible that upon binding of CMS SH3 domains to pT α , CMS may act as a scaffolding molecule enabling pre-TCR clustering (10,12,13) required for initiation and/or propagation of autonomous cell signalling.

Both TCR and pre-TCR signalling trigger cell survival and proliferation through Ca²⁺ mobilization and activation of NFAT and NF κ B transcription factors (30). We found that Ca²⁺ mobilization and NFAT (and NF κ B, not shown) transcriptional activation were defective in cells bearing a truncated pT α chain lacking the CMS binding domain (this study). It is possible that CD3 signalling modules contribute also to pre-TCR-mediated cell activation (1,2). However, we show that a proper pre-TCR function is contingent on an intact pT α polyproline-arginine domain. That pre-TCR signalling in fact involves interaction of this domain with CMS is further supported by results showing that overexpression of SH3ABC CMS domains results in enhanced NFAT transcriptional activation, an effect that was prevented by deletion of the polyproline-arginine sequence. However, we also found NFAT transcriptional activation to be essentially abrogated by overexpression of full-length CMS. A less pronounced inhibitory effect was also induced by CMS mutants lacking the SH3 domains. It is thus possible that inhibition by CMS overexpression involves the C-terminal portion of the molecule, which may have a dominant interfering effect via specific binding and sequestering of molecules implicated in the pre-TCR signalling pathway, such as tyrosine kinases Fyn and Yes (32). Alternatively, it is possible that distinct parts of the molecule may differentially affect particular functions whose interplay and coordination finally determine pre-TCR signalling output. In keeping with this latter scenario, CMS/CD2AP deficiency promotes a delayed but prolonged TCR activation resulting from a delayed onset of CD3 ζ phosphorylation and impaired receptor down-regulation (35). Constitutive pre-TCR endocytosis and degradation critically depends on the pT α cytoplasmic tail (17). Therefore, it might be expected that interaction of CMS with pT α attenuates pre-TCR signalling by promoting pre-TCR degradation, as proposed for the TCR (35). However, so far we have not succeeded in demonstrating such an effect (data not shown). While unravelling the molecular basis of CMS-mediated pre-TCR signalling will require further studies, our results allowed us to conclude that the polyproline-arginine motif of pT α provides the pre-TCR with the unique capacity to recruit signalling complexes via CMS adaptors, leading to the propagation of downstream signals in a ligand-independent manner. Further studies are required to establish whether the reiterated proline-rich motifs in murine pT α could serve an equivalent role via binding of CIN85/CMS adaptors.

Materials and Methods

Cell lines and transfection

The JR3.11 TCR α -deficient Jurkat mutant (36), the human pre-T cell line SupT1 (37), and COS7 cells were grown in RPMI 1640 (BioWhittaker) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco). Transfections were carried out by electroporation using a Gene Pulser II (BioRad), as previously described (16).

Generation of cDNA constructs

Full-length cDNAs encoding human CIN85 or CMS were amplified by PCR using total thymus cDNA as template. PCR products were cloned in-frame into the *Bam*HI/*Xho*I sites of either the pcDNA3-Flag or the pcDNA3-HA vector to obtain Flag-tagged (CIN85-Flag and CMS-Flag) or HA-tagged (CIN85-HA) constructs, respectively. Flag-tagged truncated forms of CMS and CIN85/CD2BP3 (Fig.1B, 2A and 2C) were generated by PCR using CMS-Flag and CIN85-Flag, respectively, as template. GST fusion protein constructs either for the pT α cytoplasmic domain (GST-pT α), or for the truncated proline-rich pT α mutants shown in Fig. 3A (GST-pT α Δ Pro1, GST-pT α Δ Pro2) were generated by PCR using a pcDNA3-pT α vector (16) as template, and cloned into *Bam*HI/*Xho*I sites of pGEX-4T1 vector (Amersham Biosciences). The GST-pT α Δ Pro3 fusion protein construct (Fig. 3A) was generated by *Bam*HI/*Bgl*II digestion of the GST-pT α construct and further subcloning into the *Bam*HI site of pGEX-4T3 (Amersham Biosciences). Each cloned construct was subjected to DNA sequencing. Specific primer combinations used are summarized in supplementary Table I.

Expression of GST fusion proteins and GST binding assays

GST and GST fusion proteins expressed in BL21(DE3) E. Coli bacteria under isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, Calbiochem) induction conditions (1mM for 1h at 37°C) were affinity-purified using glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences). COS7 cells were transiently transfected with either Flag- or HA-tagged CIN85 or CMS constructs (Fig. 2A and 2C). After 24 h, cells were lysed in PBS containing 1% Triton X100 (Sigma-Aldrich), supplemented with protease inhibition cocktail (Roche), 1 mM PMSF and 50mM NaF. For *in vitro* binding assays, COS7 lysates were incubated either with GST fusion proteins or with GST alone previously coupled to glutathione-Sepharose beads overnight at 4°C. After six washes, bound proteins were resolved by 12 or 8%-SDS-PAGE under reducing conditions. Immunoblotting was then performed using anti-Flag (M2, Sigma-Aldrich) or anti-HA (12CA5, Roche) mAbs plus horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch).

Immunoprecipitation assay

SupT1 cells transiently transfected with CMS-Flag or pcDNA3-Flag were lysed in 0.3% Brij96V (Fluka) and 60mM N-Octyl β D glucopyranoside (Sigma-Aldrich) containing lysis buffer (17). Cell lysates were immunoprecipitated with a polyclonal rabbit antibody against a

synthetic peptide in the human pT α cytoplasmic domain as described (16). JR3.11-transduced cells were lysed and subjected to immunoprecipitation using an anti-Flag mAb as described elsewhere (16). Immunoprecipitated proteins were analysed by immunoblotting with an anti-Flag mAb.

Isolation of thymocyte subsets

Postnatal thymocytes were isolated from thymus samples removed during corrective cardiac surgery of patients aged 1 mo to 3 yr, after informed consent was provided. Thymocyte suspensions were fractionated by centrifugation on Percoll (Amersham Pharmacia Biotech) density gradients, as described (38). Pre- β -selected (CD4⁺ CD8⁻ CD3⁻), DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ (CD4⁺ CD8⁺ CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺), and SP TCR $\alpha\beta$ ⁺ (CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ either CD4⁺/CD8⁻ or CD4⁻/CD8⁺) thymocytes obtained in the small-sized 1.09 Percoll-density fraction, and pre-TCR⁺ (CD4⁺ CD8⁺ CD3⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁻) and post- β -selected (CD4⁺ CD8⁺ CD3⁻) pre-T cells, obtained in the large-sized 1.068- density fraction were isolated by AutoMacs (Miltenyi Biotec) sorting according to their surface phenotype, as described (39). Each isolated cell subset was >95% pure upon reanalysis by flow cytometry, except the pre-TCR⁺ subset that comprised 10% of DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes, which might account for the weak TCR α transcription levels observed in this subset (Fig. 5B).

Northern Blotting

Total RNA (10 μ g) from individual thymocyte subsets was resolved by electrophoresis onto formaldehyde-agarose gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Zeta-Probe B, BioRad). Hybridization was performed with CMS and CIN85 probes, generated by PCR, and with the pT α , TCR α and β -actin probes, as described (29).

Confocal microscopy

SupT1 cells transiently transfected with CMS-GFP constructs were collected 3-4 hours after electroporation, put onto poly-L-lysine-coated coverslips, let sediment for 1 min, then centrifugate at 21x g for 1 min and fixed for 30 min at room temperature in 4% paraformaldehyde. Phalloidin-TRITC (Sigma), anti-EEA1 (BD. Biosciences), anti-CD63 or anti-Lamp1 (BD. Biosciences) staining was performed in presence of 0.05% saponin (Sigma) as permeabilizing agent. For pre-TCR aggregation, cells were incubated with an anti-CD3 (UCHT1) followed by anti-mouse-Alexa-555 (Molecular Probes) on ice. After washing, cells were incubated at 37°C for 2 min to induce capping formation, fixed and mounted into coverslips. In the bead assay, Dynabeads M-450 CD3 (Dyna) were incubated for 5 or 15 min at 37°C mixed in a 1:1 ratio with cells. Confocal microscopy was performed in a Radiance 2000 confocal microscope (BioRad) coupled to an Axiovert S100TV inverted microscope (Zeiss). Z-series of optical sections were performed at 0.5 μ m increments. In all figures, single XY plane is shown.

Retroviral infections and flow cytometry

JR3.11 cells were transduced as previously described (39) using the MigR1.1-GFP retroviral bicistronic vector (40) encoding Flag-tagged versions of either full-length pT α WT or a pT α Δ Pro1 mutant. Primer combinations used for subcloning are described in supplementary Table I. EGFP⁺ transduced cells were sorted in a FACSCVantage SE cell sorter (BD Biosciences), and analysed for CD3 expression by flow cytometry in a FACSCalibur (BD Biosciences) using an anti-CD3 ϵ (UCHT1) mAb plus APC-labelled anti-mouse Igs (BD Biosciences). Background staining was obtained with an irrelevant isotype-matched mAb plus APC-anti-mouse Igs.

Ca²⁺ mobilization assay

JR3.11 transduced cells (5x10⁶/ml) were loaded with 2 μ g/ml of Indo-1 AM (Molecular Probes) in Cell Loading Medium (HBSS containing 1mM each CaCl₂ and MgCl₂ and 1% FCS) for 30 min at 30°C in the dark. For measurements of Ca²⁺ mobilization, washed cells (10⁶/ml) were incubated in Cell Loading Medium for 5min at 37°C. Samples were analyzed on FACSCVantage SE Cell Sorter by reading the emission at 510 (FL4 channel) and 400 (FL5 channel) nm at different time points both before and after stimulation with an anti-CD3 ϵ (UCHT-1) mAb. Ionophore (Sigma) treatment was used to control for cell viability and intact calcium stores. The data were processed for calculating the FL4/FL5 emission ratio using the Three Star FlowJo software (BD Biosciences).

NFAT transcriptional activation assays

JR3.11 transduced cells were transfected by electroporation with 30 μ g of a reporter plasmid encoding the luciferase gene driven by a minimal promoter containing three tandem copies of the composite NFAT/AP1-response element from the human IL-2 gene and 2 μ g of pRL-CMV *Renilla* reporter construct (Promega) as described previously (41). When indicated, cells were cotransfected with 30 μ g of either a pcDNA3 plasmid encoding the specified Flag-tagged CMS construct or the pcDNA3-Flag empty vector. After 24 h of culture, transfected cells were cultured for additional 6 hours with or without plate-bound mAbs either against CD3 ϵ (UCHT-1, 10 μ g/ml) or against the extracellular domain of the human pT α chain (K5G3, 20 μ g/ml) (12). Aliquots of cells were then lysed according to the Dual luciferase assay Kit (Promega). For each experimental condition, firefly luciferase and *Renilla* luciferase activities were determined in duplicate samples using a luminometer Sirius (Berthold). The luciferase activity was normalized by the *Renilla* luciferase activity and expressed as fold-induction relative to the basal activity seen in unstimulated cells.

References

1. von Boehmer, H., and Fehling, H. J. (1997) *Annu Rev Immunol* **15**, 433-452
2. Malissen, B., Ardouin, L., Lin, S. Y., Gillet, A., and Malissen, M. (1999) *Adv Immunol* **72**, 103-148

3. von Boehmer, H., Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Zober, C., Garcia, C., and Buer, J. (1998) *Immunol Rev* **165**, 111-119
4. O'Shea, C. C., Thornell, A. P., Rosewell, I. R., Hayes, B., and Owen, M. J. (1997) *Immunity* **7**, 591-599
5. Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., and von Boehmer, H. (1995) *Nature* **375**, 795-798
6. Hayday, A. C., Barber, D. F., Douglas, N., and Hoffman, E. S. (1999) *Semin Immunol* **11**, 239-249
7. von Boehmer, H. (2005) *Nat Rev Immunol* **5**, 571-577
8. Borowski, C., Li, X., Aifantis, I., Gounari, F., and von Boehmer, H. (2004) *J Exp Med* **199**, 607-615
9. Irving, B. A., Alt, F. W., and Killeen, N. (1998) *Science* **280**, 905-908
10. Saint-Ruf, C., Panigada, M., Azogui, O., Debey, P., von Boehmer, H., and Grassi, F. (2000) *Nature* **406**, 524-527
11. Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., and He, H. T. (1998) *Embo J* **17**, 5334-5348
12. Ramiro, A. R., Navarro, M. N., Carreira, A., Carrasco, Y. R., de Yebenes, V. G., Carrillo, G., San Millan, J. L., Rubin, B., and Toribio, M. L. (2001) *J Immunol* **167**, 5106-5114
13. Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Ogata, K., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Wiest, D. L., Tokunaga, M., and Saito, T. (2006) *Nat Immunol* **7**, 67-75
14. Fehling, H. J., Iritani, B. M., Krotkova, A., Forbush, K. A., Laplace, C., Perlmutter, R. M., and von Boehmer, H. (1997) *Immunity* **6**, 703-714
15. Gibbons, D., Douglas, N. C., Barber, D. F., Liu, Q., Sullo, R., Geng, L., Fehling, H. J., von Boehmer, H., and Hayday, A. C. (2001) *J Exp Med* **194**, 695-703
16. Carrasco, Y. R., Ramiro, A. R., Trigueros, C., de Yebenes, V. G., Garcia-Peydro, M., and Toribio, M. L. (2001) *J Exp Med* **193**, 1045-1058
17. Carrasco, Y. R., Navarro, M. N., and Toribio, M. L. (2003) *J Biol Chem* **278**, 14507-14513
18. Panigada, M., Porcellini, S., Barbier, E., Hoeflinger, S., Cazenave, P. A., Gu, H., Band, H., von Boehmer, H., and Grassi, F. (2002) *J Exp Med* **195**, 1585-1597
19. Carrasco, Y. R., Navarro, M. N., de Yebenes, V. G., Ramiro, A. R., and Toribio, M. L. (2002) *Semin Immunol* **14**, 325-334
20. Aifantis, I., Borowski, C., Gounari, F., Lacorazza, H. D., Nikolich-Zugich, J., and von Boehmer, H. (2002) *Nat Immunol* **3**, 483-488
21. Mayer, B. J. (2001) *J Cell Sci* **114**, 1253-1263
22. Kurakin, A. V., Wu, S., and Bredesen, D. E. (2003) *J Biol Chem* **278**, 34102-34109
23. Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Haglund, K., Kowanetz, M., Husnjak, K., Taylor, J. D., Soubeyran, P., Engstrom, U., Ladbury, J. E., and Dikic, I. (2003) *J Biol Chem* **278**, 39735-39746
24. Dustin, M. L., Olszowy, M. W., Holdorf, A. D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P. A., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (1998) *Cell* **94**, 667-677
25. Dikic, I. (2002) *FEBS Lett* **529**, 110-115
26. Tibaldi, E. V., and Reinherz, E. L. (2003) *Int Immunol* **15**, 313-329
27. Watanabe, S., Take, H., Takeda, K., Yu, Z. X., Iwata, N., and Kajigaya, S. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 167-174
28. Lehtonen, S., Ora, A., Olkkonen, V. M., Geng, L., Zerial, M., Somlo, S., and Lehtonen, E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 32888-32893

29. Ramiro, A. R., Trigueros, C., Marquez, C., San Millan, J. L., and Toribio, M. L. (1996) *J Exp Med* **184**, 519-530
30. Aifantis, I., Gounari, F., Scorrano, L., Borowski, C., and von Boehmer, H. (2001) *Nat Immunol* **2**, 403-409
31. Hutchings, N. J., Clarkson, N., Chalkley, R., Barclay, A. N., and Brown, M. H. (2003) *J Biol Chem* **278**, 22396-22403
32. Kirsch, K. H., Georgescu, M. M., Ishimaru, S., and Hanafusa, H. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6211-6216
33. Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N. N., Drobot, L. B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A. M., Waterfield, M., and Buchman, V. L. (2000) *Embo J* **19**, 4015-4025
34. Kirsch, K. H., Georgescu, M. M., Shishido, T., Langdon, W. Y., Birge, R. B., and Hanafusa, H. (2001) *J Biol Chem* **276**, 4957-4963
35. Lee, K., Dinner, A. R., Tu, T., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T. N., Burak, W. R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P. M., Dustin, M. L., Chakraborty, A. K., and Shaw, A. S. (2003) *Science* **302**, 1218-1222
36. Arnaud, J., Huchenq, A., Vernhes, M. C., Caspar-Bauguil, S., Lenfant, F., Sancho, J., Terhorst, C., and Rubin, B. (1997) *Int Immunol* **9**, 615-626
37. Reynolds, T. C., Smith, S. D., and Sklar, J. (1987) *Cell* **50**, 107-117
38. Trigueros, C., Ramiro, A. R., Carrasco, Y. R., de Yébenes, V. G., Albar, J. P., and Toribio, M. L. (1998) *J Exp Med* **188**, 1401-1412
39. Garcia-Peydro, M., de Yébenes, V. G., and Toribio, M. L. (2003) *Blood* **102**, 2444-2451
40. Aster, J. C., Xu, L., Karnell, F. G., Patriub, V., Pui, J. C., and Pear, W. S. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 7505-7515
41. Cano, E., Canellada, A., Minami, T., Iglesias, T., and Redondo, J. M. (2005) *J Biol Chem* **280**, 29435-29443

FOOTNOTES

Acknowledgements- The authors thank Dr. J.C. Aster for the generous gift of MigR1.1-GFP retroviral bicistronic vector, Dr. J.M. Redondo for the luciferase-NFAT reporter plasmid; Dr. B. Rubin for the JR3.11 cell line; Dr. V.G. de Yébenes for invaluable help with the Ca^{2+} mobilization assay; J. Alcain for excellent technical assistance; and the Pediatric Cardiosurgery Units from the C.E. Ramón y Cajal and Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain) for the thymus samples. This work was supported by grants from the Plan Nacional de Biomedicina (SAF2004-01122), Comunidad de Madrid (GR/SAL/0143/2004), Fundación la Caixa (ON03/109-00) and Fundación Rodríguez Pascual. GN and PF were supported by SAF2001-1269 and SAF2004-01122 grants, respectively, and MN was supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Education. The Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” is partly supported by an institutional grant from the Fundación Ramón Areces.

The abbreviations used are: pT α , pre-T cell receptor alpha; Ca^{2+} , calcium; EGFP, enhanced green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; mAb, monoclonal antibody; NFAT, nuclear factor of activated T cell; SEM, standart error of the mean.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. *In vitro* and *in vivo* interaction of CIN85/CMS adaptors with the cytoplasmic domain of human pTα. (A) Proline-rich motifs identified in the intracytoplasmic domain of human pTα. (B) Schematic representation of the domain organization of CMS, CIN85 and CD2BP3 members of the CIN85/CMS adaptor family. (C) pTα interacts with CMS and CIN85 *in vitro*. Total cell lysates from COS7 cells transfected with CMS-Flag or CIN85-Flag were pulled-down either with a GST fusion protein construct for the pTα cytoplasmic domain (GST-pTα) or with GST alone. Immunoblotting was carried out with an anti-Flag mAb. (D) CMS interacts *in vivo* with the pTα cytoplasmic domain. Total cell lysates of SupT1 cells transfected with either an empty vector or with CMS-Flag were immunoprecipitated with a polyclonal antibody against the human pTα cytoplasmic domain. Immunoprecipitated proteins were analysed by western blotting with anti-Flag.

Fig. 2. Binding of CMS and to human pTα involves different SH3 domains. Schematic representation of CIN85 (A) and CMS (B) Flag-tagged forms used in pull-down assays. COS7 cells were transiently transfected with pcDNA3 plasmids encoding Flag-tagged versions of (C) either CIN85 or the CIN85 truncated forms shown in (A), or (D) CMS or the CMS truncated forms shown in (B). Total cell lysates from COS7 transfectants and proteins precipitated by pull-down with GST-pTα, GST-pTαΔPro2, GST-pTαΔPro3 or GST-pTαΔPro1 fusion proteins were analysed by western blotting with an anti-Flag mAb.

Fig. 3. CD2BP3 is recruited to pTα through its interaction with CMS and CIN85. (A) Total lysates from COS7 cells transfected with the indicated amounts of CD2BP3-Flag were subjected to pull-down with a GST-pTα fusion protein. Precipitated proteins were analysed by western blotting with an anti-Flag mAb. (B) COS7 cells were transiently cotransfected with a fixed amount (5μg) of CMS-Flag and with the indicated amounts of CD2BP3-Flag. Total COS7 cell lysates and proteins precipitated with GST-pTα were analysed by western immunoblotting with an anti-Flag mAb. (C) COS7 cells were transiently cotransfected with a fixed amount (15μg) of CD2BP3-Flag and with the indicated amounts of CIN85-HA. Total COS7 cell lysates and proteins precipitated with GST-pTα were analysed in parallel by western immunoblotting using either an anti-Flag mAb to detect CD2BP3 (two upper panels) or an anti-HA mAb to detect CIN85 (two lower panels). (D) COS7 cells were transiently cotransfected with fixed amounts of both CD2BP3-Flag (10μg) and CMS-Flag (5μg) and with the indicated amounts of CIN85-HA. Total COS7 cell lysates and proteins precipitated with GST-pTα were analysed in parallel by western immunoblotting using either an anti-Flag mAb to detect CD2BP3 and CMS (two upper panels) or an anti-HA mAb to detect CIN85 (two

lower panels). The asterisk corresponds to a non-specific band recognized by the anti-HA antibody.

Fig. 4. Differential regulation of CIN85/CMS transcription during human thymic development. (A) Schematic representation of the progression of the human intrathymic T-cell developmental stages analysed for CIN85/CMS gene expression. (B). Total RNA samples from the indicated cell subsets, were simultaneously hybridized by Northern blotting with CIN85 and CMS probes and re-blotted with pT α , TCR α or β -actin specific probes. (C) Amounts of CMS, CIN85 and CD2BP3 mRNA transcripts were normalized to β -actin mRNA values. Relative transcriptional levels displayed in arbitrary units are referred to values corresponding to the earliest pre- β cell stage. (D) CD2BP3/CMS and CD2BP3/CIN85 transcriptional ratios are represented as relative transcriptional amounts in arbitrary units.

Fig. 5. CMS localizes to actin-rich intracellular vesicles through C-term domain. SupT1 were transiently transfected with CMS-GFP (upper), CMS-SH3ABC-GFP (middle) or CMS-Ct-GFP (lower) constructs, fixed and stained with Phalloidin-TRITC to reveal polymerized actin.

Fig. 6. CMS localizes to the endocytic pathway in human pre-T cells. SupT1 were transiently transfected with CMS-GFP construct, fixed and stained with anti-EEA1 (upper), anti-CD63 (middle) or anti-Lamp1 (lower), revealed with anti-IgG1-Alexa555.

Fig. 7. CMS and actin cytoskeleton are recruited to CD3 sites of activation. SupT1 were transiently transfected with CMS-GFP construct and (A), incubated with anti-CD3 followed by secondary goat anti-mouse-Alexa555 in ice, and left in ice (upper panel) or stimulated for 2 min at 37°C to induce pre-TCR aggregation (lower panel), or (B), stimulated with anti-CD3 coated bead (middle and lower panel) or left unstimulated (upper panel), fixed and stained with Phalloidin-TRITC.

Fig. 8. CMS follows the pre-TCR endocytic pathway. SupT1 were transiently transfected with CMS-GFP construct and incubated with anti-pT α for 15 (A) or 30 minutes (B) at 37°C. Cells were fixed and stained with anti-Lamp1 plus anti-IgG1-Alexa647, and anti-pT α was revealed with anti-mouse-Alexa555.

Fig. 9. Binding of CMS to the human pT α cytoplasmic tail is involved in pre-TCR signalling. (A) Expression levels of pre-TCR (TCR β -pT α) heterodimers and pT α monomers expressed by JR3.11 cells retrovirally-transduced with Flag-tagged versions of either pT α WT or pT α Δ Pro1 were detected by anti-Flag immunoprecipitation, non-reducing SDS-PAGE, and western blotting with an anti-Flag mAb. (B) Surface expression levels of pre-TCR complexes on pT α -WT and pT α - Δ Pro1 JR3.11 GFP⁺-transduced cells were analysed by flow cytometry

with an anti-CD3 ϵ mAb. (C) Time-course response in calcium mobilization obtained from the indicated cell lines after stimulation with an anti-CD3 ϵ mAb. Ionophore treatment was used to control for cell viability and intact calcium stores. Data are represented as the FL4/FL5 ratio of emission analysed by flow cytometry at the indicated times. The data are representative of at least four independent experiments. (D) Deletion of the Pro1 motif (Δ Pro1) of the human pT α cytoplasmic tail impairs pre-TCR-induced NFAT transcriptional activity. pT α -WT and pT α - Δ Pro1 JR3.11 cells were transiently transfected with a NFAT-luciferase-reporter plasmid and either left nonstimulated or stimulated with either an anti-CD3 ϵ or an anti-pT α mAb. NFAT transcriptional activity analysed as described in Materials and methods is expressed as the fold increase of luciferase activity above levels obtained from nonstimulated controls. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments. (E) CMS modulates preTCR-induced NFAT transcriptional activity. pT α -WT and pT α - Δ Pro1 JR3.11 cells were transfected with either an empty vector, or the entire CMS adaptor (CMS) or CMS truncated forms encompassing the C-terminal proline-rich and coiled-coil domains (CMS C-term) or the SH3ABC domains (CMS SH3ABC) of CMS. NFAT transcriptional activity was analysed as reported in (D) upon stimulation with anti-pT α .

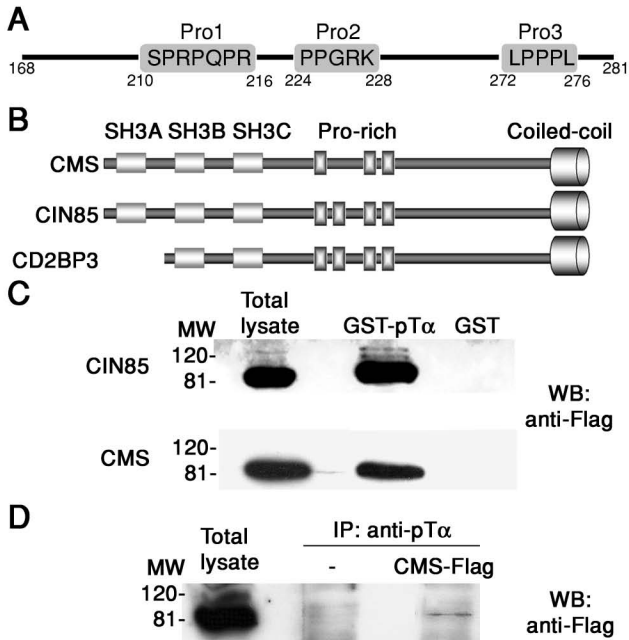


Figure 1

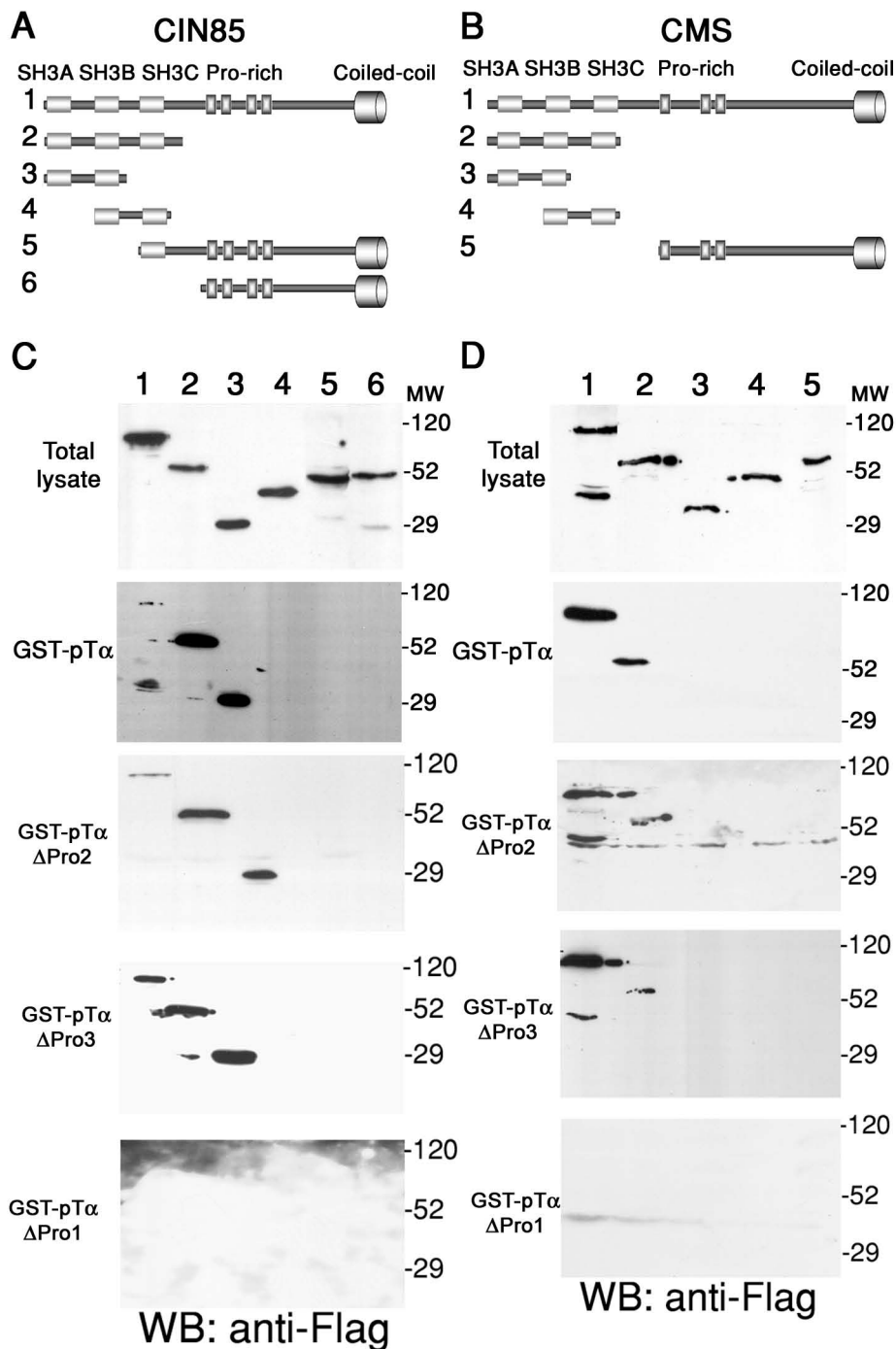


Figure 2

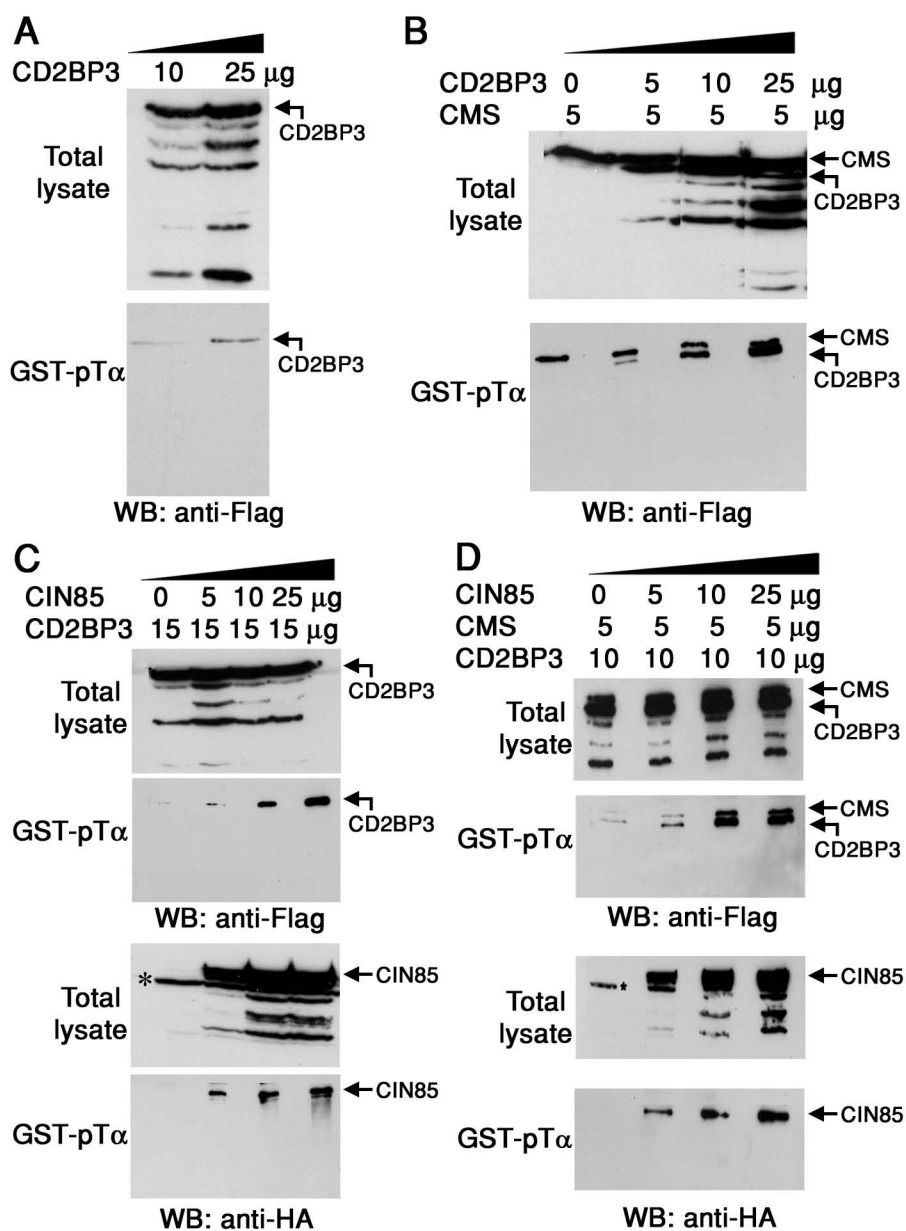


Figure 3

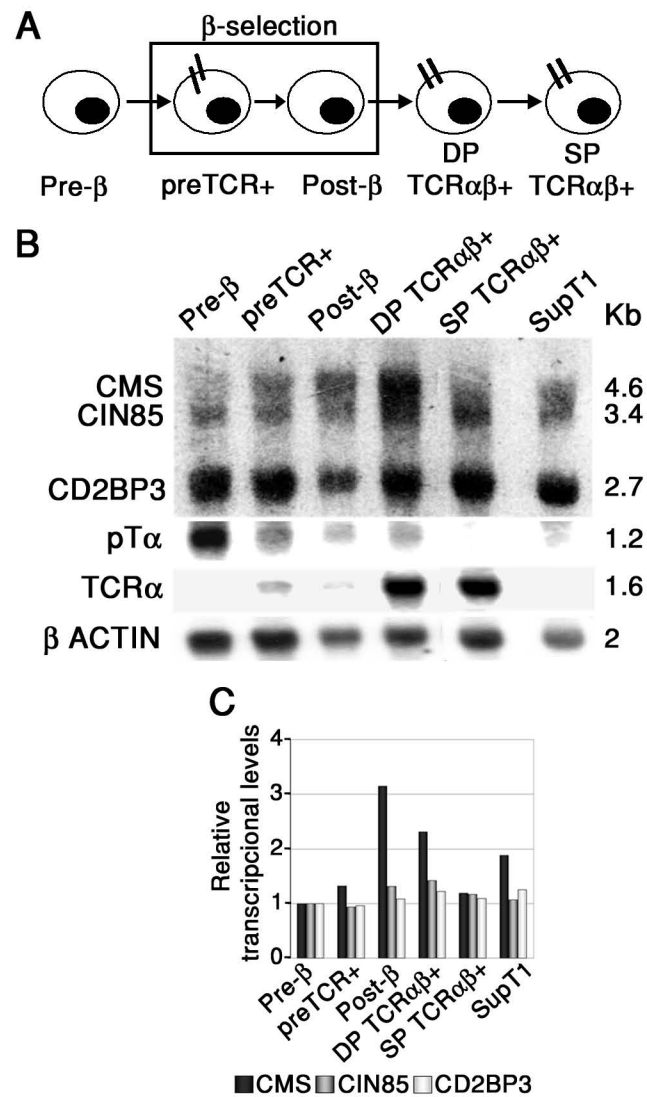


Figure 4

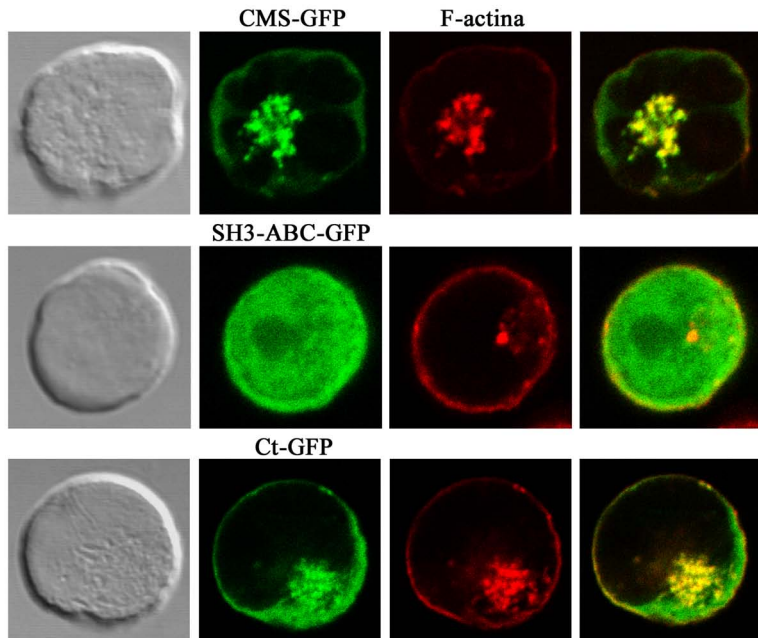


Figure 5

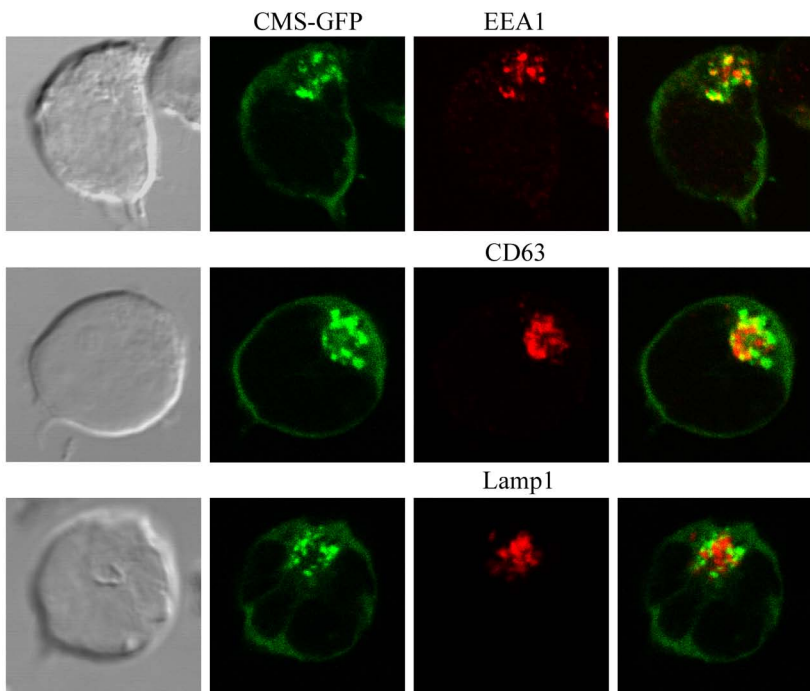


Figure 6

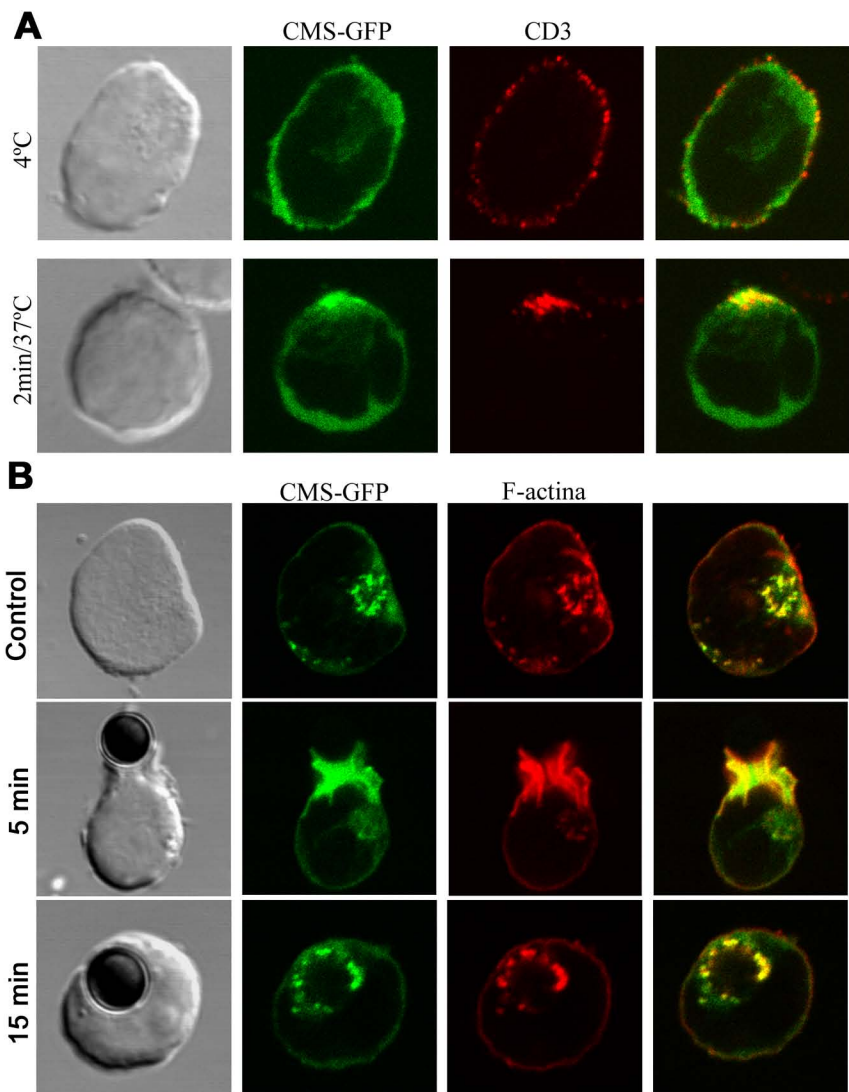


Figure 7

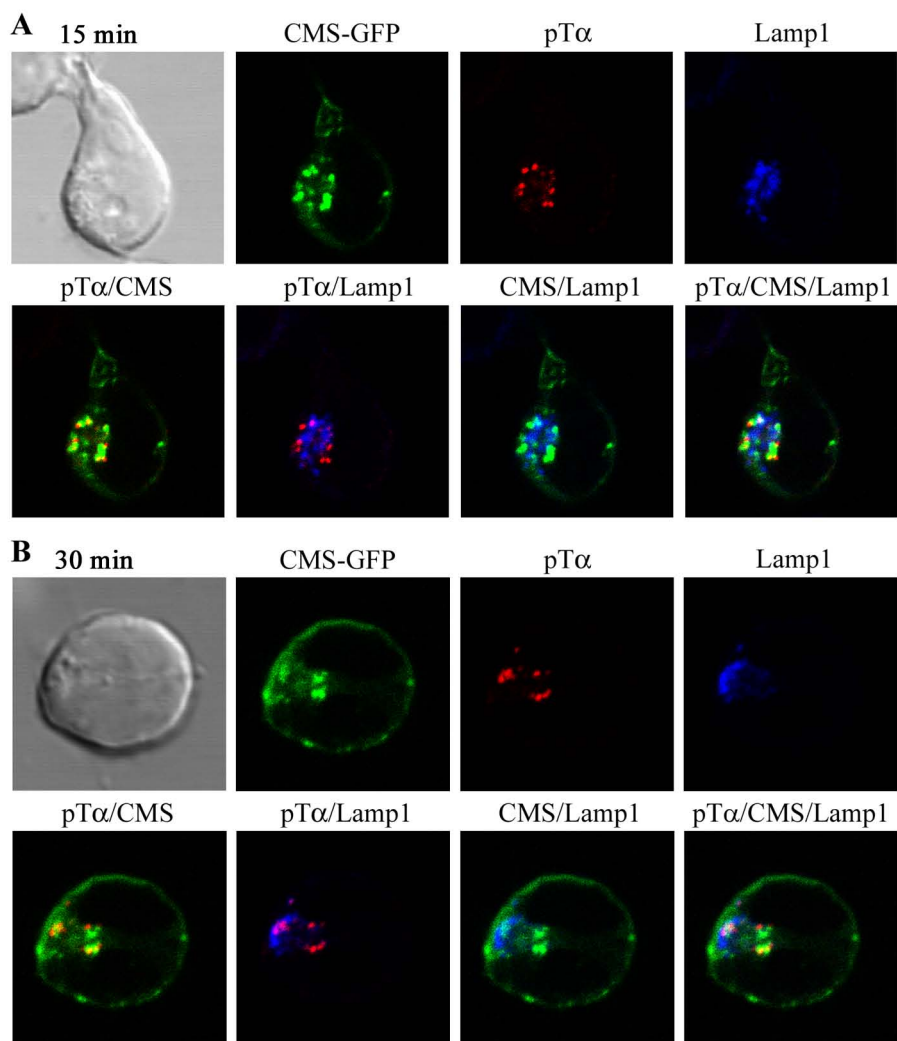


Figure 8

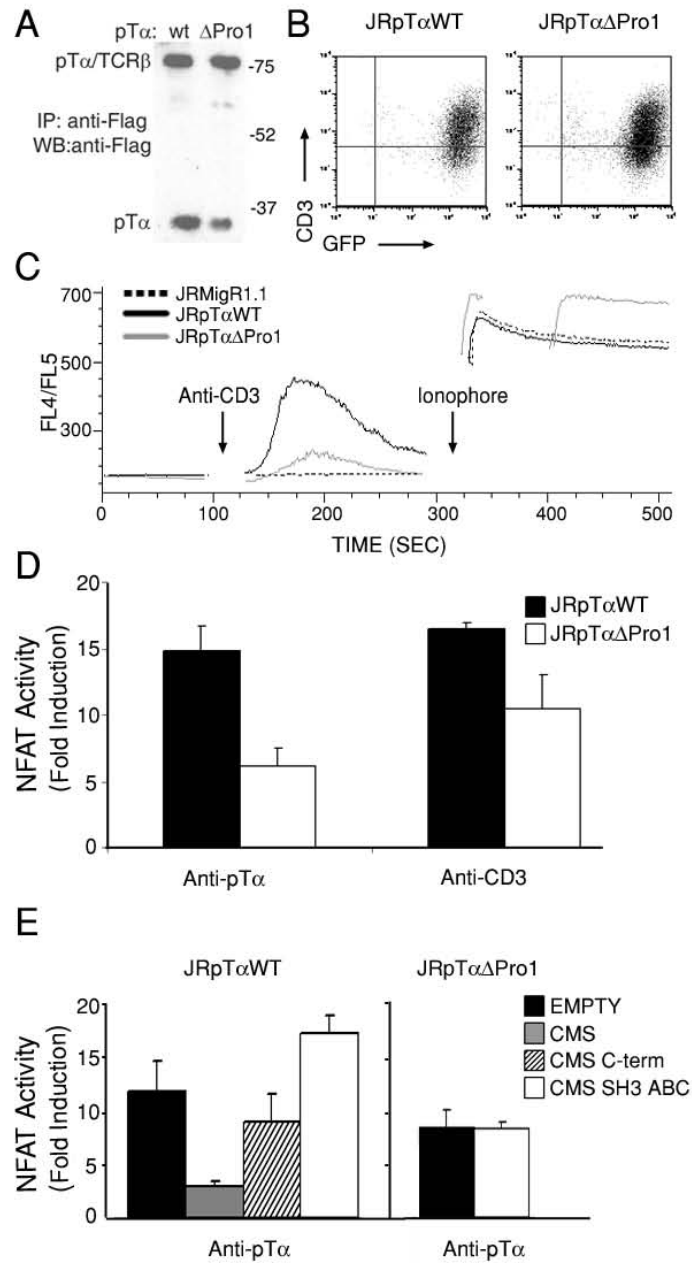


Figure 9